



LAPORAN PENELITIAN
PROYEK DUE – Like BATCH III

007107141

Judul Penelitian

**PEMBUATAN ANTI-PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$
TERLABEL ALKALIN FOSFATASE :
Suatu Upaya Penelusuran Jalur Luteolitik
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Sebagai Hormon Gertak Birahti
Dengan Menggunakan Teknik Imunohistokimia**

Oleh :

**Prof. Dr. Ismudiono, MS.,drh.
Musni Anwar, drh.
Tri Wahyu Suprayogi, M.Si.,drh.**

007107141

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
DESEMBER 2003**



HALAMAN PENGESAHAN HIBAH PENELITIAN
PROYEK DUE LIKE BATH ID

Judul :

PEMBUATAN ANTI-PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$
TERLABEL ALKALIN FOSFATASE :
Suatu Upaya Penelusuran Jalur Luteolitik
Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Sebagai Hormon Gertak Birahi
Dengan Menggunakan Teknik Imunohistokimia

Ketua Peneliti :

Nama : Prof. Dr. Ismudiono, MS.,drh.
Jenis Kelamin : Laki-laki
Pangkat/Gol. : Pembina Utama / IV-d
N I P. : 130 687 297
Jabatan : Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Unair
Fak/Jur/Puslit : Fakultas Kedokteran Hewan

Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Jangka Waktu Penelitian: 6 (enam) bulan


Biaya yang diajukan : Rp. 30.000.000,-

Mengetahui,
A/n Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Pembantu Dekan I


Nancy Dyan R., MS.,drh.
NIP. 130 687 546

Surabaya, 29 Desember 2003
Ketua Peneliti


Prof. Dr. Ismudiono, MS.,drh.
NIP. 130 687 297

Menyetujui,
Direktur Eksekutif LPIU
Universitas Airlangga

Tjahjandarie, Ph.D.
NIP. 131 801 627

RINGKASAN

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

JUDUL PENELITIAN : **PEMBUATAN ANTI-PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ TERLABEL ALKALIN FOSFATASE : Suatu Upaya Penelusuran Jalur Luteolitik Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Sebagai Hormon Gertak Birahi Dengan Menggunakan Teknik Imunohistokimia**

KETUA PENELITIAN : **Prof.Dr. Ismudiono, M.S.,drh.**

ANGGOTA PENELITIAN : **Husni Anwar, drh.**
Tri Wahyu Suproyogi, M.Si.,drh.

TAHUN : **DESEMBER 2003, 58 halaman**

Aplikasi teknologi gertak birahi secara hormonal masih dinilai terlalu mahal bagi peternak di Indonesia. Harga hormon yang mahal serta kebernasan yang belum begitu memuaskan menantik minat profesi kedokteran hewan untuk terus meneliti dengan tujuan untuk memperoleh suatu metoda gertak birahi yang mudah, murah, efisien dan selanjutnya dapat menunjang program inseminasi buatan dan transfer embrio. Preparat hormon yang dapat digunakan untuk gertak birahi pada ternak adalah hormon progesteron dan Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Aplikasi pemberian $PGF_{2\alpha}$ dapat secara intramuskular, subkutan dan intrauterin (Hafez,2000) akan tetapi terdapat kendala yaitu besarnya dosis yang dipakai serta memerlukan ketrampilan khusus. Untuk itu dilakukan alternatif pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan asumsi dosis lebih rendah, caranya mudah, tidak memerlukan keahlian khusus sehingga menjadi lebih murah dan efisien.

Tujuan penelitian ini adalah membuat suatu model teknologi pembuatan anti- $PGF_{2\alpha}$ yang dapat digunakan pada ternak lain serta untuk membakukan teknik gertak birahi dengan hormon $PGF_{2\alpha}$.

Manfaat penelitian ini dapat untuk mengkaji pembuatan anti- $PGF_{2\alpha}$ serta jalur luteolitik yang dilalui hormon $PGF_{2\alpha}$ sebagai gertak birahi yang diberikan secara submukosa vulva.

Metode penelitian ini terdiri dari dua tahap, tahap I pembuatan antibodi PGF_{2α}. Dengan cara imunisasi PGF_{2α}. Pada 8 ekor kelinci lokal jantan dengan dosis imunisasi 250 µg, 500 µg dan 750 µg dengan penambahan adjuvant CFA, booster dilakukan tiga kali dengan penambahan IFA. Pengambilan darah dilakukan sebanyak 9 kali. Selanjutnya dilakukan isolasi dan purifikasi serum dengan SAS 50%. Serum hasil purifikasi dilakukan uji karakterisasi dengan metoda dot blot, indirect elisa dan SDS PAGE. Selanjutnya dilakukan labelling anti- PGF_{2α} dengan enzim alkalin fosfatase. Penelitian tahap II pembuktian jalur luteolitik dengan cara penyuntikan PGF_{2α} secara submukosa vulva pada kambing dengan dosis 7,5 mg (perlakuan) dan 7,5 mg PBS (kontrol). Setelah 2 jam penyuntikan kambing dipotong, saluran reproduksi diambil dan dibuat preparat histologis serta dilakukan pewarnaan imunohistokimia.

Hasil penelitian tahap I pada uji karakterisasi dengan metoda dot blot terlihat bahwa pada timbulnya antibodi PGF_{2α} +CFA sudah mulai nampak pada bleeding I (minggu ke-3) dan tingkat kegelapan yang paling tajam terlihat pada kelompok II dan III pada bleeding ke 4,5,6 (minggu ke-6,7 dan 8) hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi antibodi cukup tinggi. Dengan metoda Indirect Elisa, pada preimun dan ulangan kontrol menampakkan titer negatif terhadap anti- PGF_{2α} sedang pada kelompok perlakuan mulai bleeding ke-2 menunjukkan titer positif karena nilai titer anti- PGF_{2α} diatas nilai dua kali COV (*cut of value*) . hal ini menunjukkan respon imun terbaik terhadap PGF_{2α} dengan terbentuknya anti- PGF_{2α} dihasilkan pada bleeding ke-5 Perlakuan II. Dari penentuan berat molekul antibodi dengan metode SDS-PAGE 10% terlihat bahwa antigen (PGF_{2α}) dapat mendeteksi antibodi (anti- PGF_{2α}) sebagai suatu pita-pita protein dengan rataan BM sebesar 139.7237kD.

Penelusuran jalur luteolitik pada alat kelamin kambing betina dengan teknik imunohistokimia menunjukkan adanya warna kecoklatan pada *slide* saluran alat kelamin betina yang meliputi vulva, vagina serviks, korpus

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

uten dan kornua uteri pada pematangan dua jam setelah penyuntikan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva, hal ini menunjukkan bahwa jalur luteolitik hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang diberikan secara submukosa vulva dapat dirunut perjalanannya dengan menggunakan anti-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ terlabel alkalin fosfatase dengan menggunakan teknik imunohistokimia.

(Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga , SK. Rektor nomor : 7181/ J03/ PP/ 2003, No. kontrak : HIBAH PROYEK DUE-LIKE Universitas Airlangga, Tahun Anggaran 2003/2006)



Syukur Alhamdulillah kami panjatkan ke hadirat Allah SWT atas berkah dan rahmatNya sehingga laporan hasil penelitian yang berjudul "**Pembuatan Anti-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ terlabel Alkalin Fosfatase : Suatu Upaya Penelusuran Jalur Luteolitik Prostaglandin $F_{2\alpha}$ Sebagai Hormon Gertak Birahi Dengan Menggunakan Teknik Immunohistokimia**" dapat kami selesaikan dengan baik.

Penelitian ini dapat terlaksana atas pembiayaan dan dana Hibah Penelitian Proyek Due-like Batch III tahun anggaran 2003. Pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih kepada :

1. Rektor Universitas Airlangga Surabaya
2. Ketua Lembaga Penelitian Universitas Airlangga Surabaya
3. Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
4. LPIU Proyek Due-like Batch III Universitas Airlangga Surabaya
5. Tim Panitia Hibah Penelitian Proyek Due-like Batch III program studi Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya

Kami menyadari bahwa laporan hasil penelitian masih jauh dari sempurna oleh karena itu adanya kritik dan saran yang bersifat menyempurnakan laporan ini sangat kami harapkan. Akhirnya kami berharap semoga penelitian ini bermanfaat bagi perkembangan peternakan sapi perah dan ilmu pengetahuan khususnya di bidang Bioteknologi reproduksi.

Surabaya, Desember 2003

Tim Penulis

DAFTAR ISI

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Halaman

JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii – v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Subyek Penelitian	3
1.3. Lokasi Penelitian	3
1.4. Hasil yang Diharapkan	4
BAB II TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	
2.1 Tujuan Penelitian	5
2.2 Manfaat Penelitian	5
BAB III TUNJAUAN PUSTAKA	
3.1. Peran Prostaglandin dalam Siklus Birahi	7
3.2. Hormon Prostaglandin	
3.2.1. Sejarah	9
3.2.2. Struktur Kimia Hormon Prostaglandin	10
3.2.3. Anti – PGF ₂ alfa	11
3.3. Anatomi Alat Kelamin Betina	13
3.4. Teknik – Teknik Diagnosis secara Immunologis	
3.4.1. Immunoblotting	15
3.4.2. Teknik Elisa Indirect	17
3.4.3. Immunohistokimia	18
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1. Tempat dan Waktu Penelitian	20
4.2. Populasi, Sampel dan Besar Sampel	20
4.3 Variabel Penelitian	21
4.4. Definisi Operasional Variabel	22
4.5 Bahan dan Peralatan Penelitian	22
4.6. Prosedur Penelitian	23
4.7. Rancangan dan Analisis Statistik	31
BAB V HASIL PENELITIAN	
5.1. Biosistensis anti – PGF ₂ α	
5.1.1. Immunisasi, Jumlah serum yg diperoleh, jumlah serum hasil purifikasi	35
5.2. Karakterisasi anti – PGF ₂ α	
5.2.1. Dot Blot	36
5.2.2. Titer tertinggi anti – PGF ₂ α dengan metoda Indirect Elisa	39
5.2.3. Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE	41
5.3. Labeling Anti- PGF ₂ α dengan enzim alkaline fosfatase	43

5.4. Pemeriksaan Imunohistokimia

5.4.1. Penyuntikan hormon $PGF_{2\alpha}$ pada hewan

coba

5.4.2. Pembuatan preparat histologis

5.4.3. Pemeriksaan imunohistokimia

43

43

44

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

47

DAFTAR PUSTAKA

48

LAMPIRAN

51

ABSTRAK MAHASISWA

56



Tabel 1. Rataan dan simpangan baku titer antiprostaglandin

39

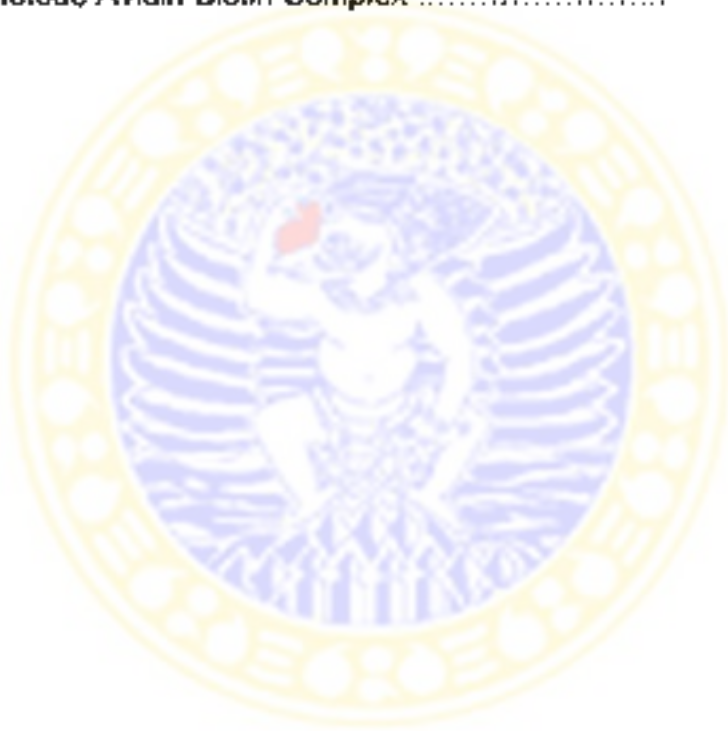


Halaman

Gambar 3.1. Immunodeteksi pada membran dengan Antigen Terperangkap	16
Gambar 3.2. Prinsip Elisa Indirect	17
Gambar 3.3. Metode Immunohistokimia Langsung, tidak Langsung dan Metode protein A	19
Gambar 4.1. Operasionalisasi Penelitian pertama	32
Gambar 4.2. Skema Immunisasi dan Pengambilan Darah	33
Gambar 4.2. Operasionalisasi Penelitian Kedua	34
Gambar 5.1. Hasil Blotting dari 64 buah serum kelompok Perlakuan	37
Gambar 5.2. Titer Antibodi pada Panjang Gelombang 405 nm	40
Gambar 5.3. Hasil SDS-PAGE Anti-PGF ₂ α	41
Gambar 5.4. Gambaran histologis saluran alat kelamin Kambing kontrol dan perlakuan	44
Gambar 5.5. Gambaran imunohistokimia saluran alat Kelamin kambing kontrol dan perlakuan	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Isolasi dan Purifikasi Anti- $\text{PGF}_2\alpha$	51
Lampiran 2. Data titer antiprostaglandin dengan teknik elisa indirect.	52
Lampiran 3. Perhitungan berat molekul pita protein	53
Lampiran 4. Prosedur Pembuatan Preparat Histologis	54
Lampiran 5. Prosedur Pewarnaan Immunohistokimia dengan Metode Avidin-Biotin Complex	55



1.1. Latar Belakang

Motto pembangunan peternakan di Indonesia adalah membangun peternakan modern, maju, mandiri dan berkesinambungan. Selanjutnya peternakan modern adalah peternakan yang memanfaatkan ilmu pengetahuan dan teknologi secara intensif guna mencapai efisiensi yang lebih tinggi.

Konsep teknologi sebagai alat dalam bidang peternakan bukanlah merupakan hal yang baru. Untuk meningkatkan daya reproduktivitas ternak, teknologi mutlak diperlukan. Teknologi gertak birahi, superovulasi, inseminasi buatan dan transfer embrio merupakan program dalam bidang peternakan yang menitikberatkan pada peningkatan mutu genetik dan produktivitas ternak melalui penerapan bioteknologi reproduksi.

Aplikasi teknologi gertak birahi secara hormonal masih di nilai terlalu mahal bagi peternak di Indonesia. Harga hormon yang mahal serta keberhasilan yang belum begitu memuaskan menarik minat profesi kedokteran hewan untuk terus meneliti dengan tujuan untuk memperoleh suatu metoda gertak birahi yang mudah, murah, efisien dan selanjutnya dapat menunjang program inseminasi buatan dan transfer embrio.

Hafez (2000), menyebutkan bahwa preparat hormon yang bisa digunakan untuk gertak birahi pada ternak adalah hormon progesteron dan hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), selanjutnya disebutkan pula bahwa aplikasi pemberian hormon $PGF_{2\alpha}$ dapat dilakukan secara intramuskuler,

subkutan dan intrauterin. Malik (2000) melakukan penelitian dengan memberikan hormon prostaglandin $F_2\alpha$ secara intraovari.

Hormon prostaglandin $F_2\alpha$ merupakan hormon derivet asam lemak yang mempunyai fungsi luteolitik terhadap korpus luteum (Skarzynski dan Okuda, 1999), disebutkan pula bahwa hormon ini bisa berperan secara sistemik dan juga secara lokal melalui *counter current transfer mechanism*.

Pemakaian hormon $PGF_{2\alpha}$ dengan berbagai aplikasi untuk tujuan gertak birahi, bukannya tanpa kendala. mahalnya harga hormon, besarnya dosis yang dipakai, perlunya tenaga terampil serta keberhasilan kebuntingan yang belum memuaskan menarik minat untuk mengembangkan bentuk aplikasi lain dari hormon $PGF_{2\alpha}$ untuk gertak birahi.

Berdasarkan berbagai aplikasi pemberian hormon $PGF_{2\alpha}$ yang telah ada, penelitian pemberian hormon $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dilakukan dengan asumsi dosis yang diberikan rendah, caranya mudah, tidak memerlukan keahlian khusus sehingga menjadi murah dan efisien. Dalam penelitian ini ingin diketahui pula jalur luteolitik dari hormon $PGF_{2\alpha}$ yang diberikan secara submukosa vulva dalam menimbulkan birahi.

1.2. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini adalah pembuatan antibodi $PGF_{2\alpha}$ yang diperoleh dari penyuntikan berulang-ulang (imunisasi) hormon $PGF_2\alpha$ dalam *complete Freund's adjuvant* dan *incomplete Freund's adjuvant* pada kelinci lokal jantan. Selanjutnya antibodi $PGF_{2\alpha}$ yang diperoleh digunakan untuk mengetahui jalur luteolitik hormon $PGF_{2\alpha}$ sebagai hormon untuk gertak birahi

yang diberikan secara submukosa vulva dalam saluran kelamin betina

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

kambing lokal dengan menggunakan teknik imunohistokimia

Penelitian ini meliputi aspek-aspek :

- a. Imunisasi $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada hewan coba (kelinci jantan) untuk memperoleh antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$
- b. Spesifikasi antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan teknik dot blot
- c. Penentuan titer antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan teknik *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)
- d. Labelling antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan enzim alkalin fosfatase
- e. Penelusuran jalur luteolitik $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam saluran alat kelamin betina kambing lokal yang sebelumnya telah disuntik dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva. Pengujian ini menggunakan teknik imunohistokimia secara langsung.

1.3. Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di kandang hewan coba Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga (untuk pembuatan antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan hewan coba kelinci jantan lokal). Laboratorium Biologi Molekuler Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan (untuk teknik dot blot, ELISA), Laboratorium Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (untuk labelling anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan teknik imunohistokimia) dan Taman Ternak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga di kecamatan Kedamean-Gresik (untuk pemeliharaan hewan coba kambing betina).

1.4. Hasil yang diharapkan

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Beberapa keluaran utama dari penelitian ini adalah .

- a. Pembuatan antibodi $\text{PGF}_2\alpha$ untuk deteksi keberadaan hormon $\text{PGF}_2\alpha$ eksogen.
- b. Pembakuan teknik gertak birahi secara submukosa vulva
- c. Perbaikan fertilitas dan reproduktivitas ternak



BAB II
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga
TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

2.1. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dirancang untuk tujuan jangka pendek dan tujuan jangka panjang.

2.1.1. Tujuan jangka pendek

Tujuan jangka pendek yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah mengembangkan bentuk-bentuk bioteknologi yang meliputi aspek-aspek :

- a. Pembuatan antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$
- b. Spesifikasi antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan teknik dot blot
- c. Penentuan titer antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan teknik ELISA
- d. Labelling antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan enzim alkaline fosfatase
- e. Pemakaian teknik imunohistokimia untuk mengetahui keberadaan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan menggunakan antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$

2.1.2. Tujuan jangka panjang

Tujuan jangka panjang yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah :

- a. Membuat suatu model teknologi pembuatan anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang dapat digunakan pada ternak lain.
- b. Pembakuan teknik gertak birahi dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva
- c. Mendukung program inseminasi buatan yang selanjutnya dapat meningkatkan fertilitas dan reproduktivitas ternak.

2.2. Manfaat Penelitian

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Hasil Penelitian ini diharapkan dapat bermanfaat bagi :

- a. Peneliti, sebagai bahan informasi ilmiah dalam rangka mengkaji pembuatan anti-PGF_{2α} serta jalur luteolitik yang dilalui oleh hormon PGF_{2α} sebagai hormon gertak birahi yang diberikan secara submukosa vulva.
- b. Mahasiswa yang terlibat, memberikan pengetahuan teoritis dan praktis serta ketrampilan dalam pembuatan anti-PGF_{2α} serta dapat melakukan uji-uji imunologis seperti dot blot, elisa dan teknik imunohistokimia
- c. Peternak, sebagai bahan informasi tentang aplikasi hormon PGF_{2α} secara submukosa vulva untuk gertak birahi.

3.1. PERAN PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ DALAM SIKLUS BIRAH

Siklus birahi dapat diartikan sebagai jarak timbulnya satu periode birahi ke permulaan periode birahi berikutnya. Setiap spesies hewan mempunyai ciri khas pola siklus birahnya, kambing sebagai hewan poliestrus memperlihatkan gejala birahi secara periodik sepanjang tahun (Ismudiono, 1999).

Siklus birahi diatur oleh hormon-hormon dari hipotalamus, hipofisis, ovarium dan uterus. Panjang siklus berkisar antar 17 – 25 hari dengan rata-rata panjang siklus $20,2 \pm 2,3$ hari pada kambing dara dan $21,3 \pm 3,7$ hari pada kambing dewasa. Berdasarkan fungsi ovariumnya, siklus birahi terbagi menjadi fase folikuler dan fase luteal. Fase folikuler meliputi serangkaian kegiatan yang dimulai sejak luteolisis dan berakhir saat folikel dominan pada ovarium mengalami ovulasi. Karakteristik fase luteal adalah terdapatnya korpus luteum pada ovarium yang mensekresi hormon progesteron sampai terjadinya regresi korpus luteum (Hafez, 2000).

Gertak birahi bertujuan untuk mengendalikan siklus birahi sehingga periode birahi pada sekelompok ternak betina terjadi secara serentak (Partodihardjo, 1992). Dasar fisiologis dari gertak birahi adalah hambatan pelepasan *luteinizing hormone* (LH) dari hipofisis anterior sehingga dapat menghambat pematangan folikel de Graaf atau penghilangan korpus luteum secara mekanik atau fisiologis dengan pemberian preparat luteolitik seperti PGF_{2 α} (Hunter, 1995). Menurut Milvae (2000) regresi korpus luteum diinisiasi

oleh $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang berasal dari uterus. Sedangkan menurut Hafez (2000)
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

$\text{PGF}_{2\alpha}$ jika disuntikkan pada hewan yang berada dalam fase diestrus akan menyebabkan regresi korpus luteum sehingga akan menghilangkan umpan balik ke hipofisis anterior untuk melepaskan hormon gonadotropin sehingga akan terjadi birahi 48 – 72 jam setelah penyuntikan. Selanjutnya Milvae *et al.* (1996) menyatakan bahwa korpus luteum dikontrol oleh sejumlah faktor-faktor luteotropik yang mendukung selama siklus birahi dan kebuntingan.

Lima hipotesis mekanisme kerja $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam meregresi korpus luteum adalah : 1. $\text{PGF}_{2\alpha}$ langsung mempengaruhi hipofisis, karena hipofisis sangat penting dalam mempertahankan aktivitas korpus luteum, 2. $\text{PGF}_{2\alpha}$ dapat menginduksi luteolisis melalui uterus dengan jalan menstimuler kontraksi uterus, sehingga uterus mengeluarkan luteolisin endogen, 3. $\text{PGF}_{2\alpha}$ langsung bereaksi sebagai racun terhadap sel-sel luteal, 4. $\text{PGF}_{2\alpha}$ bersifat anti-gonadotropin, interaksi antara $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan gonadotropin terjadi dalam sirkulasi darah atau pada reseptor di korpus luteum, 5. $\text{PGF}_{2\alpha}$ mempengaruhi aliran darah ke ovarium (Phamis, Tillson dan Erickson yang dikutip oleh Setiawan dan Hamidjojo, 1982). Selanjutnya berdasarkan hasil penelitian Niswander *et al.* (1980) efek vasokonstriksi $\text{PGF}_{2\alpha}$ mungkin yang menyebabkan terjadinya hipoksia dan selanjutnya menyebabkan luteolisis. Penelitian Cumming dan Lawson (1973) yang dikutip Ismudiono (1982) menyatakan bila arteri ovarica dipisahkan dari vena yang menuju uterus maka kehidupan korpus luteum dapat diperpanjang. Hal ini membuktikan bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ dialirkan dari vena uterina ke arteri ovarica berdasarkan keseimbangan konsentrasi. Pendapat lain dari Milvae (2000) tentang

mekanisme kerja $\text{PGF}_{2\alpha}$ menyebutkan bahwa proses luteolitik pada ruminansia dimulai dengan membanjirnya $\text{PGF}_{2\alpha}$ dari uterus, selanjutnya akan mempengaruhi sel endotel untuk menghasilkan endothelin-1 yang akan menghambat proses steroidogenesis pada fase luteal.

Skarzynski et al.(2000) menyebutkan bahwa beberapa cara telah dikembangkan untuk mengetahui mekanisme kerja hormon, salah satunya dengan menggunakan metoda *direct enzyme immunoassay* (EIA) melalui preparasi antagonis atau anti hormon yang dikehendaki, selanjutnya disebutkan pula bahwa antisera $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan antisera telah banyak PGE_2 digunakan untuk keperluan tersebut.

3.2. Hormon Prostaglandin

3.2.1. Sejarah

Von Euler pada tahun 1935 pertama kali menemukan suatu zat yang dihasilkan oleh kelenjar prostat manusia yang selanjutnya diberi nama prostaglandin. Prostaglandin merupakan suatu zat yang dapat menurunkan tekanan darah serta dapat memacu kontraksi usus dan uterus (Djojosoebagro,1996).

Prostaglandin dapat disintesis oleh berbagai organ seperti paru, hati, ginjal dan limpa serta efeknya sangat beraneka ragam. Pembentukannya dapat dirangsang oleh berbagai stimuli. Dalam jumlah sangat kecil hanya beberapa nanogram saja sudah cukup untuk menimbulkan berbagai efek seperti vasodilatasi, kontraksi uterus, usus maupun bronchus (Setiawan, 1983).

Menurut Labhsetwar (1974) yang dikutip oleh Ismudiono (1982)

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

mengatakan bahwa didalam ovarium domba maupun sapi terdapat suatu zat mirip prostaglandin, selanjutnya prostaglandin dapat dipisahkan hampir pada semua jaringan tubuh seperti ovarium, cairan amnion, plasma semen, uterus, otot jantung, ginjal, sumsum tulang belakang dan pankreas. Hafez (1993) menyebutkan bahwa prostaglandin dengan cepat akan terdegradasi dalam darah segera setelah pemberian secara suntikan, dan akan menimbulkan efek fisiologis jika diberikan dengan dosis yang tinggi.

Diantara kelima kelompok utama prostaglandin, yang berhubungan erat dengan proses reproduksi adalah $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan PGE_2 . Hormon prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ mempunyai efek lebih baik daripada PGE_2 dalam proses meregresikan korpus luteum. Selain itu $\text{PGF}_{2\alpha}$ juga mempengaruhi peningkatan kontraksi tuba fallopi dalam transport sel telur dan spermatozoa pada waktu birahi dan perkawinan (Ismudiono,1999).

3.2.2. Struktur Kimia Hormon Prostaglandin

Senyawa prostaglandin merupakan derivat asam lemak esensial yang mempunyai 20 atom karbon yang mengandung 3,4 atau 5 ikatan tidak jenuh disebut asam lemak prostanoat. Penamaan prostaglandin menurut huruf alfabet (A, B, E dan F) didasarkan pada struktur dari cincin siklopentan (Djojosoebagio,1996). Selanjutnya disebutkan pula bahwa kelompok PGF kemudian dibedakan lagi bergantung pada gugusan hidroksil yang terdapat pada atom karbon

ke-9 apakah berada pada kedudukan trans (α) atau cis (β), dan
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

kelompok PGF yang trans terbagi lagi berdasarkan ikatan ganda yang terdapat dalam struktur hormon tersebut menjadi $\text{PGF}_{1\alpha}$, $\text{PGF}_{2\alpha}$, dan $\text{PGF}_{3\alpha}$. Hormon prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ mempunyai rumus kimia $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$ dengan berat molekul 476,6 (*Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents*, 1991).

Berdasarkan struktur kimianya, prostaglandin dikelompokkan dalam lima kelompok besar yaitu PGA, PGB, PGC, PGE dan PGF. Perbedaan antara satu dengan lainnya terletak pada gugusan fungsional yang terletak pada cincin segi lima (*cyclo pentane*). Setiap jenis prostaglandin mempunyai fungsi yang berbeda-beda antara lain berpengaruh terhadap saluran pencernaan, saluran pernafasan, sistem saraf pusat serta saluran reproduksi (Ismudiono, 1999).

3.2.3. Anti-prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$

Artama (1992) menyebutkan bahwa bersamaan dengan masuknya antigen ke dalam tubuh, maka perangkat imun akan memberikan respon berupa suatu kaskade reaksi yang terkenal dengan sentral imunologi dogma. Selanjutnya disebutkan pula bahwa sesuai dengan banyaknya antigen determinan, maka suatu antigen akan menstimulasi sejumlah limfosit-B yang mempunyai reseptor sesuai dengan epitop yang akan berproliferasi menghasilkan antibodi yang spesifik.

Prostaglandin mempunyai fungsi sangat beragam dan terdapat perbedaan antara prostaglandin tipe yang satu dengan tipe lainnya.

atau merangsang sintesis prostaglandin melalui berbagai mekanisme. Mekanisme kerja zat-zat penghambat atau antagonis prostaglandin ada tiga macam yaitu antagonis farmakologik, antagonis kimiawi dan antagonis fungsional (Djojosoebagio,1996) Dikatakan pula bahwa antagonis farmakologik mempunyai kemampuan untuk mengacaukan pembentukan atau ikatan antara agonis dengan reseptor (*antagonist receptor complex*). Selanjutnya dikatakan bila suatu zat yang dapat berikatan dengan reseptor di mana seharusnya merupakan tempat ikatan agonis disebut antagonis bersaing (*competitive antagonist*), ikatan antara antagonis - reseptor dapat bersifat tidak mantap (*reversible*) dan mantap (*irreversible*). Cara kerja antagonis kimiawi adalah menurunkan atau menghilangkan sama sekali aktivitas biologik agonis dengan jalan melakukan interaksi kimia dengan molekul agonisnya. Kelompok antagonis fungsional bekerja dengan jalan mengurangi agonis tanpa melibatkan reseptor. Beberapa zat yang secara alamiah mempunyai fungsi menghambat sintesis prostaglandin adalah asetilkolin, katekolamin, histamin, dan 5-hydroxythryptamin. Selanjutnya beberapa peneliti melakukan sintesis beberapa zat yang mempunyai kesamaan dengan prostaglandin dengan jalan mengikatkan atom oksigen pada atom karbon nomer 7 pada struktur prostaglandin, zat ini mempunyai fungsi sebagai antagonis prostaglandin.



telah dikembangkan untuk mengetahui mekanisme kerja hormon, salah satunya dengan menggunakan metoda *direct enzyme immunoassay* (EIA) melalui preparasi antagonis atau anti-hormon yang dikehendaki. selanjutnya disebutkan pula bahwa antisera $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan antisera PGE_2 telah banyak digunakan untuk keperluan tersebut.

3. 3. Anatomi Alat Kelamin Betina

Cusunan anatomi alat kelamin betina pada umumnya terdiri dari alat kelamin utama yaitu gonad atau ovarium; saluran reproduksi yang terdiri dari tuba fallopii, uterus, serviks dan vagina; dan alat kelamin luar yang terdiri dari vulva dan klitoris. Didalam rongga pelvis alat kelamin betina digantung oleh beberapa alat penggantung. Ovarium digantung oleh alat penggantung mesovarium dan ligamentum utero-ovarica, tuba fallopii digantung oleh mesosalphink, sedangkan uterus, serviks dan sebagian vagina digantung oleh mesovarium atau ligamentum lata (Ismudiono, 1999).

Ovarium merupakan suatu kelenjar reproduksi yang dapat menghasilkan ovum dan hormon kelamin. Tuba fallopii merupakan saluran sempit berujung lebar, sebagai tempat fertilisasi dan selanjutnya meneruskannya ke uterus. Pada bagian yang melebar terdapat rambut getar. Uterus terdiri dari kornua uteri, korpus uteri dan serviks uteri. Pada kornua dan korpus memungkinkan telur yang sudah dibuahi tumbuh sampai saat dilahirkan. Sedangkan serviks uteri merupakan tempat pengunci uterus sewaktu ada kebuntingan (Hardjopranjoto, 1982)

untuk deposisi air mani sewaktu kopulasi. Vulva sebagai jalan keluar dari
urni dan sebagai pintu gerbang alat kelamin dengan dunia luar
(Frandsen, 1992).

Vaskularisasi ovarium berasal dari ramus ovaricus dari arteri ovarica
yaitu cabang dari arteri spermatica interna. Ramus ovaricus ini juga
mengalirkan darah ke tuba fallopii. Vaskularisasi uterus dilakukan oleh arteri
uterina cranialis yang merupakan cabang arteri spermatica interna dan arteri
uterina media yang berasal dari arteri umbilicalis yang merupakan cabang
dari arteri hypogastrica. Arteri uterina caudalis membenarkan darah pada
serviks dan sebagian vagina (Hardjopranjoto, 1982).

Vulva (*Pudendum femininum*) merupakan ujung paling belakang dan
alat kelamin betina yang meliputi *klitoris*, *labium minora* dan *labium mayora*.
Labium minora berupa lipatan mukosa yang membentuk dinding lateral
vestibulum. Epitelnya berupa epitel berlapis pipih dan bagian tengahnya
terdiri atas jaringan ikat yang banyak mengandung pembuluh darah, terdapat
juga papila tinggi yang menjorok jauh kedalam epitel. Kelenjar sebacea
terdapat pada kedua permukaannya dan tidak dilengkapi dengan folikel
rambut. *Labium mayora* berwujud lipatan kulit yang menutupi *labium minora*.
Permukaan dalamnya halus, tidak berambut. Permukaan luarnya diliputi
epidermis dengan lapisan tanduk dan mempunyai rambut, kelenjar keringat
dan sebacea. Bagian tengah setiap bibir mengandung cukup banyak jaringan
lemak dan sedikit serat otot polos (Leeson dkk., 1992).

dorsalis yang membulat dan comisura ventralis yang runcing. Labia vulva berambut halus dapat berpigmen atau tidak tergantung pada spesiesnya. Didalam subkutisnya terdapat lapisan lemak disamping beberapa urat daging sirkuler dan spinkter yang menutup saluran vulva dan dunia luar. Bidang dalam labia vulva berubah menjadi selaput lendir kutan yang dilanjutkan dengan vestibulum vagina. Labia vulva biasanya tertutup rapat karena adanya otot spinkter. Vaskulasasi vulva dan vestibulum berasal dari arteri urogenitalia, pudenda eksterna dan interna (Salisbury,1985; Frandson, 1992)

3.4. Teknik-teknik Diagnosis secara Immunologis

3.4.1. Immunoblotting.

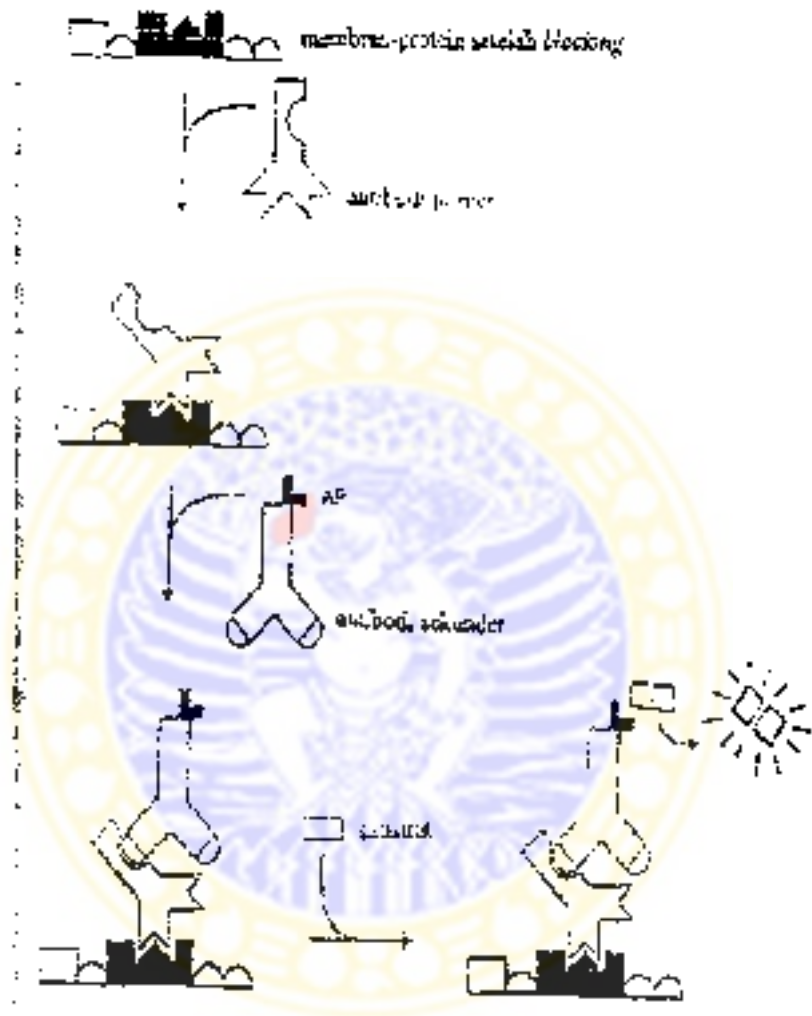
Salah satu metode immunoblotting yang dapat digunakan adalah dot blotting yaitu suatu metode untuk mendeteksi keberadaan antigen (Goers,1993). Prosedurnya adalah antigen ditetaskan pada membran *nitrocellulose* atau *polyvinylidene difluoride* (PVDF) dan diinkubasikan dalam antibodi, tanpa adanya pemisahan melalui sodium dodecyl sulphonat polyacrilamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) sehingga dot blotting hanya mengetahui keberadaan antigen dan tidak memberikan informasi berat molekul.

Reaksi spesifik antara antigen dan antibodi dikonfirmasi dengan antibodi *conjugate alkaline fosfatase* sebagai antibodi sekunder dan direaksikan dengan substrat. Dot blotting dapat

digunakan untuk menerapkan secara kualitatif konsentrasi antigen

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

dengan intensitas warna yang ada pada membran (Goers,1993).



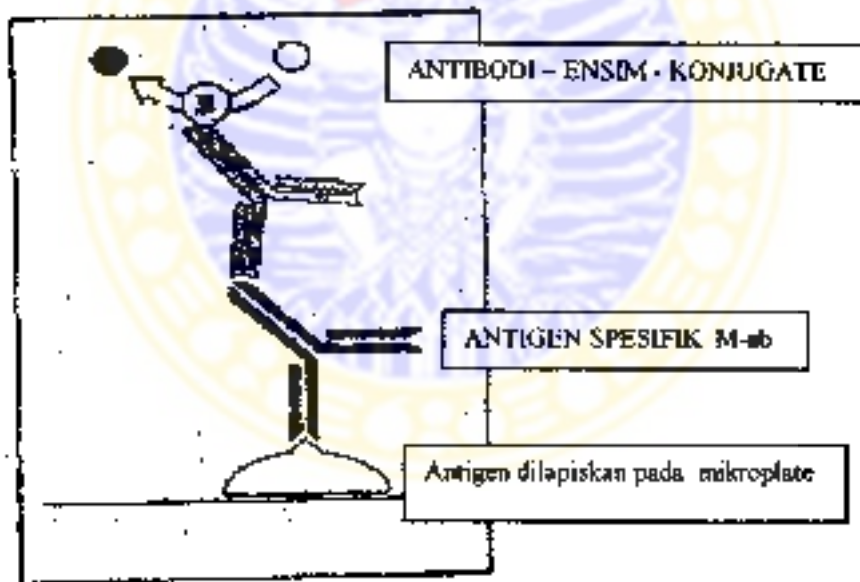
Gambar 3.1.. Immunodeteksi pada membran dengan antigen terperangkap (Promega,1996)

3.4.2. Teknik *Enzyme Linked Immonosorbent assay Indirect*

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Model ini banyak digunakan di berbagai tingkatan laboratorium, karena bahan yang digunakan untuk tes ini sudah banyak dipasarkan dan mudah dibeli. Model ini tidak memerlukan keahlian khusus untuk konjugasi hanya saja dari segi biaya sedikit lebih besar oleh karena model ini memerlukan konjugat fragmen imunoglobulin anti imunoglobulin yang akan dideteksi. Semisal yang akan dideteksi adalah IgG maka diperlukan konjugat fragmen imunoglobulin anti IgG.

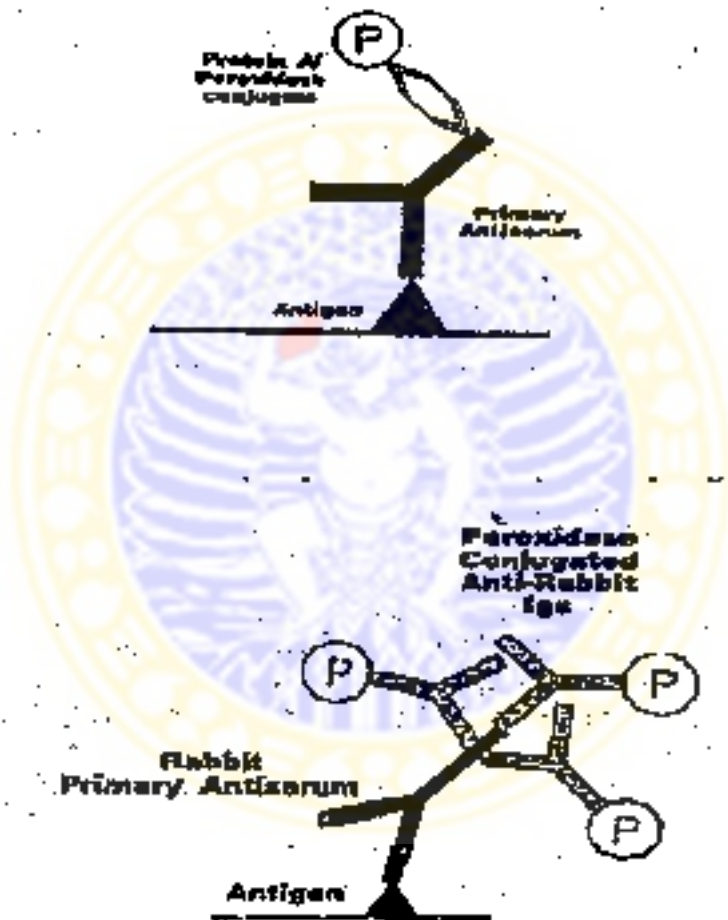
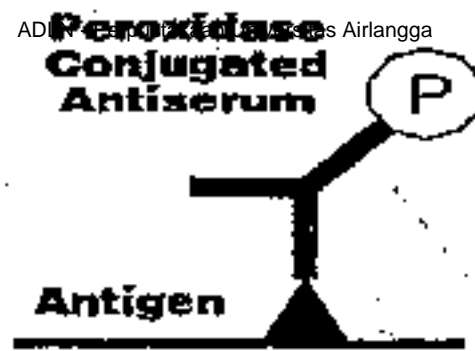
Hasil tes ini lebih spesifik dan sering digunakan secara rutin untuk diagnosis antigen maupun antibodi.



Gambar 3.2. Prinsip Elisa *Indirect*

Imunohistokimia merupakan gabungan antara histologi/sitologi dan imunologi. Imunohistokimia adalah suatu metode pewarnaan substansi/bahan aktif di dalam jaringan dengan menggunakan prinsip-prinsip dasar imunologi yaitu pengikatan bahan aktif (antigen) pada sisi aktif yang spesifik oleh suatu anti-bahan aktif (antibodi). Hasil reaksi antigen-antibodi ini dapat diidentifikasi pada spesimen bila antibodi diikat oleh suatu penanda (*marker*) berupa fluoresen, enzim, bahan partikel atau isotop yang dapat divisualisasikan, sehingga dapat menandai keberadaan bahan aktif tersebut dalam jaringan. Bahan aktif tersebut dapat berupa protein, karbohidrat, asam nukleat, lemak, bahan-bahan alami lainnya serta bahan-bahan sintetik (Nurhidayat, 2002; Setijanto, 2002).

Beberapa syarat yang harus dipenuhi dari metode ini adalah bahan aktif tersebut harus dapat membentuk antibodi yang spesifik terhadap bahan aktif tersebut bila disuntikkan ke *host* kedua yang berbeda dengan *host* tempat asal bahan aktif tersebut. Bahan aktif tersebut juga harus terakumulasi dalam jumlah cukup di dalam sel atau jaringan sehingga dapat diikat oleh antibodi spesifik serta dapat divisualisasikan. Stabilitas dan determinan antigen yang akan diidentifikasi dalam jaringan serta sifat alamiah dan antigen dan proses penanganan jaringan (Setijanto, 2002)



Gambar 3.3.. Metode imunohistokimia langsung, tidak langsung dan metode protein A (Sumber :Beesley, 1995)

4.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari dua tahap. Penelitian tahap pertama dilakukan di laboratorium Fisiologi Reproduksi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, laboratorum bersama Biomolekuler FKH-Unair dan laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya dalam membuat anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ terlabel alkalin fosfatase. Penelitian tahap kedua dilakukan di Taman Temak Pendidikan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan laboratorum biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dalam membuat preparat untuk pemeriksaan imunohistologis dari saluran reproduksi. Penelitian ini dilakukan selama enam bulan yang dimulai pada bulan Juli sampai dengan bulan Desember 2003.

4.2. Populasi, Sampel dan Besar Sampel

Populasi penelitian pertama adalah sekelompok kelinci lokal jantan yang berasal dari sebuah peternakan di Batu- Malang untuk biosintesis anti-prostaglandin. Sampel penelitian adalah kelinci lokal jantan yang telah dewasa kelamin dengan berat 1,5 – 2 kg. Besar sampel delapan (8) ekor. Populasi penelitian kedua adalah sekelompok kambing lokal betina yang berasal dari sebuah peternakan kambing di Mojokerto. Sampel penelitian adalah kambing lokal betina yang telah beranak dan berada dalam fase luteal. Besar sampel lima (5) ekor.

dapat dilihat pada gambar 4.1 dan 4.2.

4.3. Variabel Penelitian

4.3.1. Penelitian I

Variabel bebas (*Independent variable*)

Berbagai dosis pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara subkutan pada kelinci jantan

Variabel terikat (*dependent variable*)

- Antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ dalam serum darah kelinci jantan
- Ikatan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ terlabel alkalin fosfatase

Variabel kendali

Umur kelinci jantan, Waktu pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$, Waktu pengambilan darah

4.3.2. Penelitian II

Variabel bebas (*Independent variable*)

Berbagai dosis pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva pada kambing betina

Variabel terikat (*dependent variable*)

- Ikatan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ terlabel alkalin fosfatase

Variabel kendali

Umur kambing betina, Waktu pemberian $\text{PG F}_{2\alpha}$

4.4. Definisi Operasional Variabel

1. $\text{PGF}_{2\alpha}$ adalah hormon derivat asam lemak yang secara fisiologis diproduksi oleh jaringan endometrium uterus dan dipakai untuk induksi birahi pada sekelompok ternak.
2. Antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ adalah antibodi hasil respon pemberian $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada kelinci jantan yang diketahui dengan metoda dot blot
3. Antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ terlabel Alkaline fosfatase adalah suatu zat anti yang diperoleh dengan cara penyuntikan pada kelinci jantan yang telah mengalami proses pematangan dan telah dilabel dengan enzim alkaline fosfatase
4. Ikatan antigen antibodi terlabel alkaline fosfatase pada saluran alat kelamin betina untuk membuktikan jalur luteolitik $\text{PGF}_{2\alpha}$ di dalam saluran alat kelamin setelah penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan menggunakan teknik imunohistokimia.

4.5. Bahan dan Peralatan Penelitian

Pada penelitian pertama digunakan kelinci lokal jantan yang sehat, telah melewati usia pubertas, berat badan berkisar antara 1,5 – 2 kg. Hewan percobaan pada penelitian kedua adalah kambing lokal betina, sehat, pernah beranak, dengan berat badan sekitar 25 – 30 kg.

Bahan dan reagen yang dipakai dalam penelitian pertama adalah hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Glandin N, Lohmann Animal Health GmbH & Co.KG.Jerman) , *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) produksi Sigma Chemical Company USA,

SAS 50 % (*Saturated Ammonium Sulphate*), PBS (*Phosphat Buffer Saline*) pH 7 , *Skim Milk*., *Aquadest*, *Tween 20* (*Tween 20 - Polyoxyethylen sorbitan monolaurat*, Art. 822184, *Merck - Schuchardt*, *Munchen*), NaN_3 (*Sodium Azide*), *Substrat Western Blue* (*Western Blue stablized*, *Substrate for Alkaline Phosphatase* Cat # S 3841, *Promega Corporation*, *USA*, *Anti Rabbit- IgG AP* (*Anti-Rabbit IgG G (Fc)*, *AP Conjugate*, *Catalog # S 3731*, *Promega Corporation-USA*), *kertas nitroselulose* (*Hybond-C pure*, *Nitrocellulose membrane* *Amersham Life Science-England*), *kertas tissue*, *Carbonate-bicarbonate*, *BSA* (*Bovine Albumin Serum*, , MgCl_2 , NaOH , *TBS* (*Tris Buffer Saline*), *SAS 50%* (*Saturated Amonium Sulfat*), *Phosphatase-alkaline* (*orthophosphoric, monoester phosphohydrolase- Sigma Chemical Co*), *Glutaraldehyde 0,25%*, *Sedangkan peralatan yang digunakan adalah Blotter* (*Bio-Dot Apparatus*, *BIORAD-USA*), *Microplate*, *Elisa-reader*, *vacum pump*, *vortex*, *gunting*, *pipet eppendorf*, *plastik tip*, *cawan petri*, *gunting* , *kantong selofan*, *sentrifuk*, *tabung reaksi*, *magnetik stirer*, *refrigerated centrifuge*, *freezer* , *autoclaf*, *peralatan gelas*, *peralatan seksi*, *vaccutainer*,

4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1.Tahapan penelitian pertama

Penelitian ini menggunakan kelinci jantan sebagai hewan coba dengan tahapan penelitian pendahuluan sebagai berikut :

- a. Pembuatan antibodi prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ melalui induksi beberapa variasi dosis $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada kelompok hewan coba



- b. Isolasi dan purifikasi serum hewan coba yang telah diinduksi oleh hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ menggunakan sentrifugasi dan SAS 50%
- c. Karakterisasi anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ hasil isolasi serum hewan coba berdasarkan reaksi imunologis menggunakan dot blotting
- d. Pengukuran titer antibodi dengan menggunakan teknik elisa *indirect*
- e. Penentuan berat molekul dengan menggunakan metoda *sodium dodecyl sulphonat polyacrilamed gel elektroforesis* (SDS-PAGE)
- f. Labelling anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan enzim alkalin fosfatase

4.6.1.1. Biosintesis anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$

a. Persiapan hewan coba

Hewan coba yang dipakai untuk tujuan biosintesis anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ adalah kelinci lokal jantan yang diperoleh dari sebuah peternakan kelinci di Batu. Dua (2) ekor kelinci disebut sebagai kelompok kontrol di imunisasi dengan PBS dan CFA/IFA. Enam (6) ekor kelinci diinduksi dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ masing-masing dua ekor dengan dosis 250 μg ; 500 μg dan 750 μg

- b. Imunisasi hewan coba dengan $\text{PGF}_{2\alpha}$ untuk masing-masing dua ekor kelinci dengan dosis 250 μg ; 500 μg dan 750 μg atau setara dengan 50 μL ; 100 μL dan 150 μL yang ditambah dengan ajuvan CFA. Penyuntikan dilakukan secara subkutan. Perbandingan antigen dengan ajuvan 1: 1. Semua kelompok hewan coba di imunisasi ulang

(booster) dengan penyuntikan PGF_{2α} dengan berbagai
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

dosis ditambah IFA sebanyak 3 kali, booster I dilakukan pada minggu ke 3, booster II pada minggu ke 4 dan booster III pada minggu ke 5. Dosis pemberian booster sama dengan dosis imunisasi I, pengambilan darah dilakukan pada minggu ke 1,3,4,5,6,7 dan 8. Cara penyiapan emulsi dilakukan dengan meneteskan pelan-pelan ajuvan dalam PGF_{2α} sambil di vortex, sampai tercampur dan membentuk emulsi secara sempurna.

c Isolasi dan purifikasi serum

Pengambilan darah untuk memperoleh antibodi PGF_{2α} dilakukan melalui vena auricularis pada kelompok hewan coba yang telah di imunisasi dengan hormon PGF_{2α} menggunakan spuit disposibel, setelah itu dilakukan pemisahan serum dengan metoda sentrifugasi (1500 rpm selama 20 menit). Presipitat dibuang, supernatannya dipindahkan dengan pipet eppendorf dan disimpan pada suhu - 20°C.

Serum hasil isolasi selanjutnya ditambah dengan *Saturated Amonium Sulfat* (SAS 50%) dengan perbandingan 1 : 1 dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 4 °C selama beberapa menit. Serum disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Supernatan dibuang, presipitat dicuci dengan SAS 50% (10X volume pelet), kemudian dihomogenkan

dengan menggunakan vortex. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu 4 °C selama 30 menit. Presipitat ditambah dengan 0,05 M buffer fosfat pH 7 pada volume 1 ml. dilanjutkan dialisis dalam 0,01 M bufer fosfat pH 7, semalam pada suhu 4 °C.

d. Karakterisasi anti-PGF₂α melalui dot blotting

Karakterisasi antibodi PGF₂α juga dilakukan berdasarkan spesifisitas reaksi dengan PGF₂α dan dianalisis menggunakan metode dot blotting. Prosedur kerjanya sebagai berikut : sampel PGF₂ alfa sebagai antigen diencerkan 20 – 40 kali dengan PBS pH 7,4. Selanjutnya ditetaskan pada membran nitrocellulose yang sudah diletakkan pada alat dot blotter untuk dikeringkan. Setelah kering, membran direndam dalam PBS-susu skim 5% sebagai blocking selama 1 jam sambil digoyang. Selanjutnya dicuci dengan PBS tween-20 0,05% selama 3 menit sebanyak 3 kali. Membran diinkubasi dengan antibodi primer (antibodi PGF₂α) yang telah diencerkan 50 – 200 kali dengan PBS-susu skim 1% pada suhu kamar sambil digoyang selama 2 jam. Membran dicuci dengan PBS tween-20 0,05% selama 3 menit dan diulang 3 kali. Kemudian diinkubasi dengan antibodi sekunder (*anti rabbit IgG AP conjugate* yang diencerkan dengan PBS 1 : 1000). Selama 1 jam pada suhu kamar dan dicuci lagi dengan PBS-tween 20 0,05%. Selanjutnya membran direndam dalam substrat *western blue*

sampai muncul warna dengan intensitas yang jelas, reaksi
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga
dihentikan dengan aquades.

e. Pengukuran titer antibodi dengan teknik Elisa indirect

Antibodi PGF₂ α yang dihasilkan dilakukan karakterisasi berdasarkan nilai titer antibodi dengan teknik *Indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Prosedur kerjanya sebagai berikut :

Antigen dengan kadar 10 $\mu\text{g/ml}$ dilarutkan dalam bufer karbonat-bikarbonat (*coating buffer*)(pengenceran 50 kali) selanjutnya dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μl tiap *well*, selanjutnya diinkubasi pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ selama semalam. Kemudian *microplate* dicuci dengan PBS tween-20 sebanyak 4 kali, setelah itu *blocking buffer* dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μl tiap *well*, inkubasikan pada suhu ruang selama 2 jam. *Microplate* cuci kembali dengan PBS tween-20 sebanyak 4 kali. Antibodi PGF₂ α sebagai antibodi primer dilarutkan ke dalam *blocking buffer* BSA 1% dengan seri pengenceran 50 kali, selanjutnya dimasukkan ke dalam *microplate* masing-masing 50 μl tiap *well*, inkubasikan pada suhu 4 $^{\circ}\text{C}$ selama semalam. *Microplate* dicuci kembali dengan PBS tween-20 sebanyak 4 kali. Selanjutnya *anti-rabbit IgG* berlabel alkalin fosfatase dilarutkan dalam PBS tween-20 dengan pengenceran 1/2500, dimasukkan pada *microplate* sebanyak 50 μl tiap *well*. kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam.

Microplate dicuci dengan PBS tween-20 sebanyak 4 kali lalu substrat p-NPP dalam diethanolamin 10% dimasukkan pada *microplate* masing-masing sebanyak 50 μ l tiap well. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruang gelap, kemudian tambahkan NaOH 3 M (*stop reaction*) sebanyak 50 μ l tiap well. Setelah itu diukur titer antibodi dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm.

f. Penentuan berat molekul dengan metoda gel elektroforesis

Persiapan Gel. Plat Gel dibuat dengan merangkai dua plat dengan jarak antara plat \pm 1 mm. Gel dibuat dua lapis yaitu gel sebagai tempat pengumpulan sampel (*stacking gel*) dan gel sebagai media untuk pemisahan protein (*separating gel*). Campuran *separating gel* dimasukkan kedalam plat (tempat lapisan gel) dengan menggunakan pipet mikro, dibiarkan hingga terbentuk gel . Berikutnya *stacking* dituang diatas *separating gel* sambil dipasang sisir, didiamkan beberapa menit kemudian sisir diangkat dan plat dipasang pada alat elektroforesis dan dituangkan *buffer* pada bejana elektroforesis (Sumitro, 1996).

Injeksi Sampel. 10 μ L sampel dalam eppendorf ditambahkan *Reducing Sample Buffer* (RSB) dengan volume yang sama dengan sampel, dihomogenkan, dipanaskan pada suhu 100 °C selama dua menit, kemudian didinginkan dan sampel siap

diinjeksikan pada sumur. Untuk protein standar perlakuan sama seperti seperti sampel dan diinjeksikan pada sumur paling kiri. Kemudian di jalankan dengan arus 20 mA, 600 Volt selama 2-3 jam

Pewarnaan dan Pencucian Gel. Gel hasil elektroforesis diwarnai dengan cara merendam dalam larutan *Coomassie Brilliant Blue* selama 30-60 menit, digoyang dan kemudian dilakukan pencucian gel dengan cara merendam gel dalam larutan *destaining* (pencuci)selama 24 jam dengan tetap digoyang .

Penentuan Massa Molekul Relatif Protein (Mr). Mr ini dapat ditentukan dengan menggunakan protein standar yang dilanjutkan dengan menghitung mobilitas relatif (Rf).

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita protein dari tempat awal}}{\text{Jarak pergerakan warna pelacak dari tempat awal}}$$

Selanjutnya dibuat kurva standar dari protein standar sehingga dari kurva ini akan dapat ditentukan massa molekul relatif sampel.

g. Labelling anti-PGF₂ alfa dengan enzim alkalin fosfatase

Labelling antibodi PGF_{2α} dilakukan dengan enzim alkalin fosfatase. Tujuan pelabelan ini untuk memberi tanda pada antibodi sehingga bila terikat dengan antigen (PGF_{2α}

eksogen) yang terdapat dalam saluran alat kelamin betina akan dapat divisualisasikan dengan bantuan mikroskop cahaya.

Pelabelan dilakukan dengan metode Goer (Goer, 1993) dengan urutan sebagai berikut : Antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebanyak 0,5 ml dalam PBS ditambah dengan enzim alkalin fosfatase sebanyak 3 mg/ml, kemudian ditambahkan glutaraldehyde sampai 0,20% sambil divortex, inkubasikan selama 2 jam pada suhu kamar. Larutan dimasukkan ke dalam kantong selofan dan di dialisis dalam *Tris Buffer Saline* (TBS) yang mengandung 1 mM MgCl_2 , selanjutnya tambahkan *Bovine Serum Albumine* (BSA) sampai 0,2% kemudian simpan dalam suhu 4°C

4.6.2. Tahapan penelitian kedua

Penelitian tahap kedua menggunakan kambing betina lokal sebagai hewan coba. Kambing dalam status fase luteal disuntik dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebanyak 7,5 mg secara submukosa vulva. Selang satu jam dan dua jam, kambing disembelih, selanjutnya saluran alat kelamin betina diambil dan dipreparir untuk pemeriksaan imunohistokimia.

Pemeriksaan Imunohistokimia

Saluran alat kelamin hewan coba (vulva, vagina, servik dan uterus) diambil dan dipotong-potong selanjutnya potongan organ tersebut dimasukkan dalam sukrosa 30% kemudian diblok dengan larutan koloid (PBS + skim 5%). Pemotongan dilakukan dalam *cryostat* yang bersuhu -20°C sampai 25 °C.

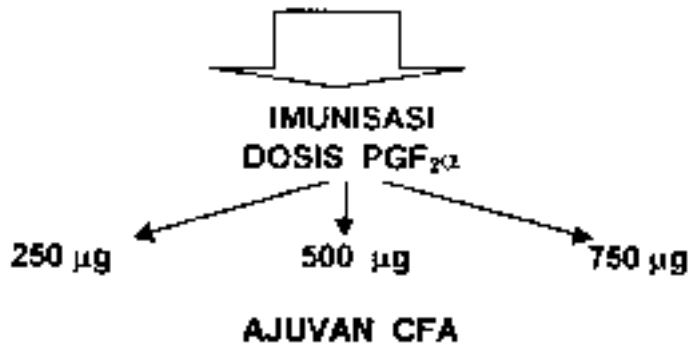
Selanjutnya dilakukan pewarnaan imunohistokimia dengan metode langsung yaitu berdasarkan ikatan antigen ($\text{PGF}_{2\alpha}$) – antibodi (antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$) yang telah dilabel alkalin fosfatase dan akan divisualisasikan dengan penambahan kromogen (*western blue*) (Nurhidayat, 2002; Setijanto, 2002)

Tujuan pemeriksaan ini untuk mengetahui jalur luteolitik $\text{PGF}_{2\alpha}$ eksogen dalam saluran alat kelamin berdasarkan ikatan $\text{PGF}_{2\alpha}$ dan antibodi $\text{PGF}_{2\alpha}$ terlabel yang dicirikan dengan adanya gambaran warna kebiruan dalam jaringan.

4.7. Rancangan dan Analisis Statistik

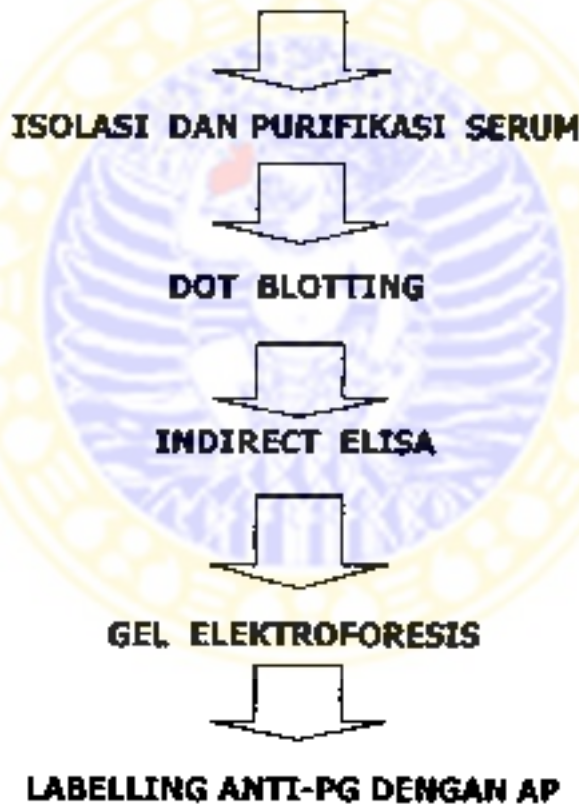
Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap dan analisis data dari penelitian eksplorasi laboratorium untuk menentukan titer antibodi tertinggi dianalisis dengan uji anova satu arah dan bila terdapat perbedaan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji BNT. Pemeriksaan imunohistokimia di analisis dengan menggunakan uji khi-kuadrat (Steel and Torrie, 1995).

**PERSIAPAN HEWAN COBA
(KELINCI LOKAL JANTAN)**



BOOSTER 3 KALI DENGAN AJUVAN IFA

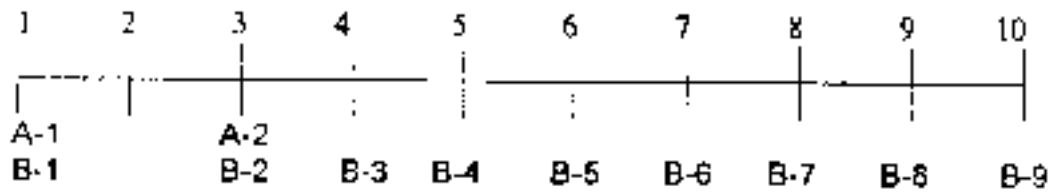
PENGAMBILAN DARAH 9 KALI



Gambar 4.1. Operasionalisasi Penelitian Pertama

**MINGGU KE
KELINCI KONTROL**

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

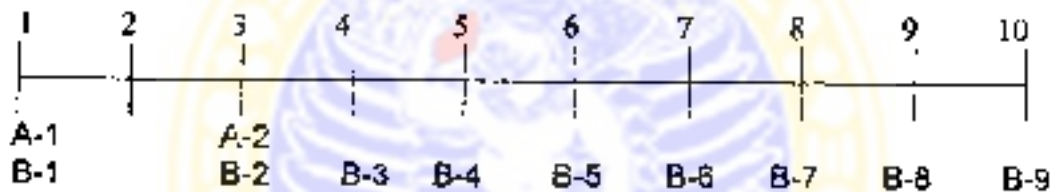


A-1 : PBS DALAM AJUVAN CFA

A-2 : PBS DALAM AJUVAN IFA

B-1 s/d B-9 : PENGAMBILAN DARAH

**MINGGU KE
KELINCI PERLAKUAN**



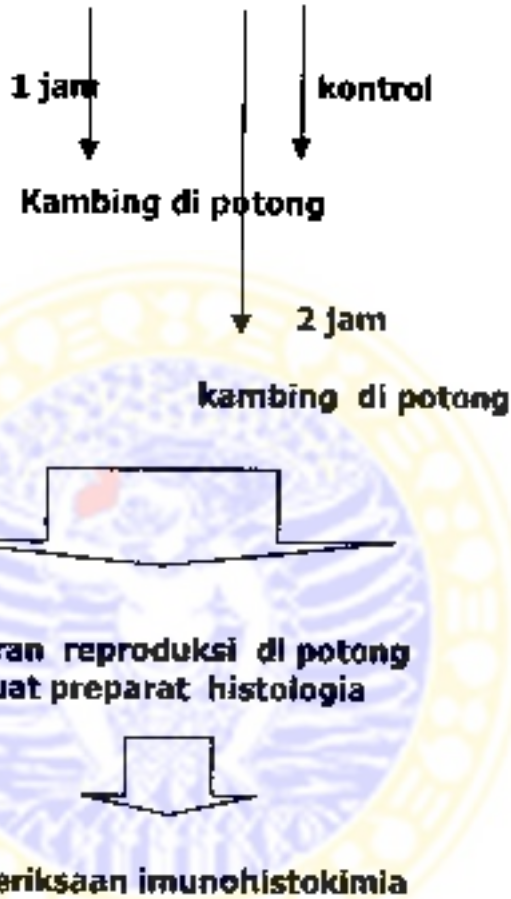
A-1 : PGF_{2α} DALAM AJUVAN CFA

A-2 : PGF_{2α} DALAM AJUVAN IFA

B-1 s/d B-9 : PENGAMBILAN DARAH

Gambar 4.2. Skema Imunisasi dan pengambilan darah

**SUNTIK $\text{PGF}_{2\alpha}$
SECARA SUBMUKOSA VULVA
DOSIS 7,5 mg**



Gambar 4.2. Operasionalisasi Penelitian Kedua

5.1. Biosintesis anti-prostaglandin $F_2\alpha$

5.1.1. Imunisasi, Jumlah Serum yang Diperoleh, Jumlah Serum hasil Purifikasi

Imunisasi

Imunisasi telah berhasil dilakukan pada 8 ekor kelinci lokal jantan, dengan rincian 2 ekor sebagai kontrol (mendapatkan suntikan PBS + CFA, *booster* PBS + IFA), dua ekor sebagai perlakuan I (mendapatkan suntikan 250 μ g $PGF_{2\alpha}$ + CFA, *booster* 250 μ g $PGF_{2\alpha}$ + IFA), dua ekor sebagai perlakuan II ((mendapatkan suntikan 500 μ g $PGF_{2\alpha}$ + CFA, *booster* 500 μ g $PGF_{2\alpha}$ + IFA) dan dua ekor sebagai perlakuan III ((mendapatkan suntikan 750 μ g $PGF_{2\alpha}$ + CFA, *booster* 750 μ g $PGF_{2\alpha}$ + IFA).

Jumlah serum yang diperoleh

Darah diambil dari vena auricularis, pengambilan darah (*bleeding*) dilakukan sebanyak 9 kali, dengan demikian didapatkan sebanyak 72 vial serum masing masing sebanyak 1,5 cc.

Jumlah serum hasil purifikasi

Setelah dilakukan purifikasi dengan menggunakan SAS 50% (Lampiran 1) maka didapatkan 72 vial serum hasil purifikasi masing-masing sebanyak 0,5 cc, dengan rincian pre-imun (*bleeding* 1) sebanyak 8 buah dan 64 buah sisanya terdiri dari serum kontrol, perlakuan I,II dan III (delapan kali *bleeding*).

5.2. Karakterisasi antibodi prostaglandin $F_2\alpha$

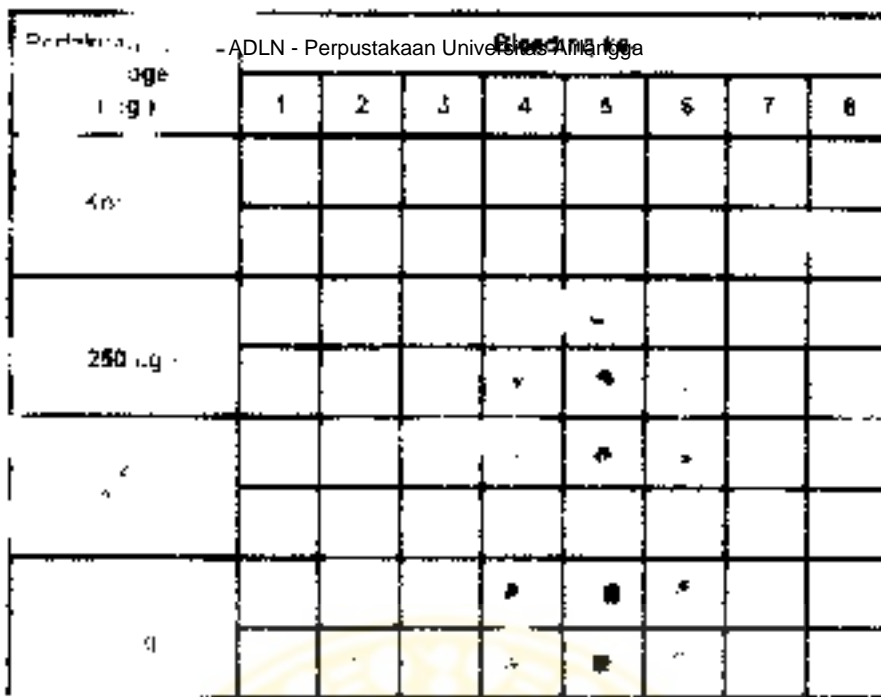
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Karakterisasi ini bertujuan untuk mengetahui apakah antibodi yang timbul setelah dilakukan imunisasi dengan hormon prostaglandin $F_2\alpha$ adalah anti- prostaglandin $F_2\alpha$. Karakterisasi untuk mengetahui spesifisitas antibodi dilakukan dengan menggunakan teknik dot blot, *indirect elisa* dan teknik SDS-PAGE.

5.2.1. Dot blot

Untuk membuktikan bahwa $PGF_2\alpha$ mampu menginduksi anti- $PGF_2\alpha$ dilakukan uji spesifitas. Data uji spesifitas secara kualitatif dilakukan berdasarkan metode Dot Blot menggunakan alat Dot Blotter (BioRad), dihasilkan data berupa gambar visualisasi terjadinya reaksi spesifik antara antigen ($PGF_2\alpha$) dengan antibodi (anti- $PGF_2\alpha$) berupa noda biru keunguan.

Hasil blotting dari 64 buah serum yang telah dilakukan purifikasi yang terdiri dari kontrol, perlakuan I, II dan III dengan delapan kali *bleeding* dapat dilihat pada Gambar 5.1 dibawah ini.



Gambar. 5.1 Hasil blotting dari 64 buah serum purifikasi

Pada Gambar 5.1. tampak adanya gradasi warna noda sebagai hasil reaksi antigen ($\text{PGF}_{2\alpha}$) dengan antibodi (anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$). gradasi warna ini dipengaruhi oleh variasi konsentrasi ikatan antigen dan antibodi.

Timbulnya antibodi akibat penyuntikan $\text{PGF}_{2\alpha}$ + CFA sudah mulai nampak pada bleeding 1 (minggu ke-3). Berdasarkan gradasi warna yang nampak ternyata kelompok II dan III pada bleeding ke 4, 5 dan 6 (minggu ke-6, 7 dan 8) menunjukkan tingkat kegelapan yang paling tajam, hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi antibodi cukup tinggi. sedangkan penurunan kadar antibodi mulai tampak pada semua perlakuan saat bleeding ke-7 (minggu ke-9 setelah booster III).

Hasil blotting juga menggambarkan bahwa konsentrasi antibodi yang ditunjukkan oleh gradasi warna yang paling tajam pada perlakuan II dan III adalah sama, sehingga dapat dikatakan bahwa dosis optimal untuk imunisasi adalah perlakuan II (dosis PGF_{2α} sebesar 500 µg)

Dari hasil Dot Blotting tersebut membuktikan bahwa imunisasi berulang PGF_{2α} dengan penambahan adjuvant CFA dan IFA yang mempunyai epitop yang dapat berinteraksi dengan antibodi hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya noda biru keunguan pada membran nitroselulose. Imunisasi berulang juga terbukti dapat meningkatkan antibodi yang terbentuk, hal ini dapat dilihat dengan peningkatan gradasi warna pada minggu ke-3 sampai dengan minggu ke-7. Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Artama (1992) bahwa imunisasi secara berulang dengan selang waktu tertentu akan meningkatkan respon imun dengan cara menstimulir sejumlah klon sel B untuk menghasilkan antibodi serta juga sebagai sel memori.

Baratawidjaja (2000) menyebutkan bahwa reaksi hipersensitivitas tipe II dan reaksi hipersensitivitas tipe IV akan membentuk antibodi jenis IgG dan IgM. Peranan *cell mediated immunity* (CMI) diawali dengan dipresentasikannya antigen oleh *antigen presenting cell* (APC). Selanjutnya APC akan mengaktifkan sel T dan yang terakhir akan melepas berbagai limfokin seperti *interleukin-2* (IL-2), *macrophage inhibition factor* (MIF), *macrophag activation factor* (MAF) dan *tumor inhibition factor* (TNF) dengan

berbagai fungsi. IL-2 merupakan limfokin utama yang dilepas baik oleh sel T yang berperan pada CMI maupun oleh sel Th yang membantu sel B dalam memproduksi antibodi.

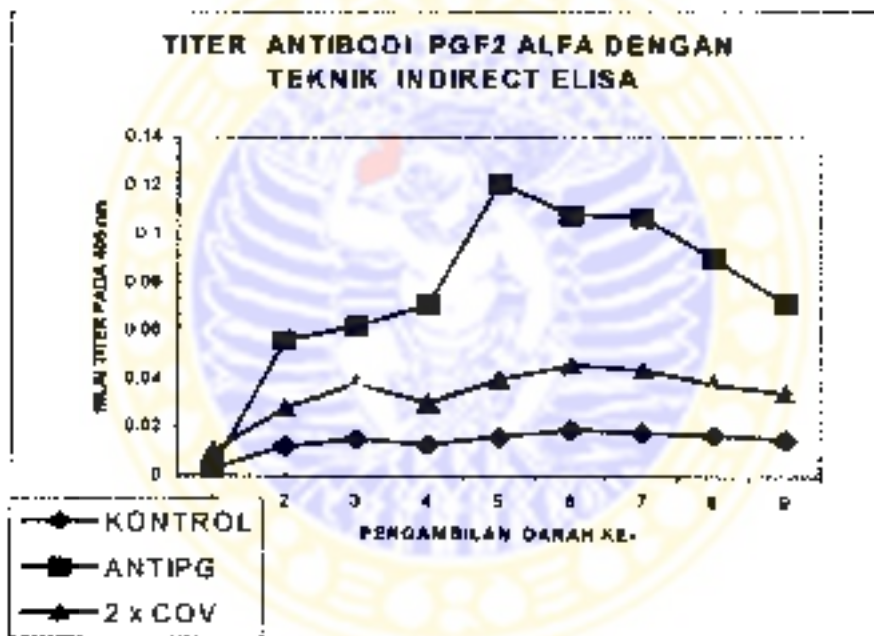
5.2.2. Titer tertinggi Anti- prostaglandin $F_2\alpha$ dengan metoda elisa indirect

Secara kuantitatif kemampuan $PGF_{2\alpha}$ untuk menginduksi anti- $PGF_{2\alpha}$ dapat diukur dengan metode Indirect Elisa. Hasil pengamatan nilai antibodi hasil induksi $PGF_{2\alpha}$ dapat dilihat pada Tabel 5.1. Sedangkan analisis titer anti- $PGF_{2\alpha}$ yang diukur dengan teknik indirect elisa dapat dilihat pada Lampiran2.

Tabel 5.1. Rataan dan simpangan baku serta COV titer anti- $PGF_{2\alpha}$ dan kontrol dengan Metoda Indirect Elisa

Breed ke-	Kontrol (rataan \pm sd)	Perlakuan (rataan \pm sd)	COV (rataan kontrol)+ 2SD)	2 X COV
	0,003 \pm 0,001	0,003 \pm 0,001	0,005	0,01
2	0,012 \pm 0,001	0,056 \pm 0,001	0,014	0,028
3	0,015 \pm 0,002	0,062 \pm 0,003	0,019	0,038
4	0,013 \pm 0,001	0,071 \pm 0,003	0,015	0,03
5	0,016 \pm 0,002	0,121 \pm 0,004	0,02	0,04
6	0,019 \pm 0,002	0,108 \pm 0,003	0,023	0,046
7	0,018 \pm 0,002	0,107 \pm 0,006	0,022	0,044
8	0,017 \pm 0,002	0,090 \pm 0,002	0,019	0,038
9	0,015 \pm 0,001	0,074 \pm 0,002	0,017	0,034

Elisa rider pada panjang gelombang 405 nm setelah sampel diinkubasi selama 30 menit. Titer anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dinyatakan positif bila menunjukkan nilai lebih dari dua kali rata-rata kontrol negatif (cut of value, COV). COV ditentukan dengan rata – rata kontrol negatif ditambah 2 – 3 simpangan baku. Hasil pembacaan titer anti - $\text{PGF}_{2\alpha}$ dapat digambarkan seperti pada gambar 5.2. dibawah ini :



Gambar 5.2. Titer Anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada panjang gelombang 405 nm

Seperti terlihat pada gambar 5.2, bahwa pada preimun dan ulangan kontrol menampakkan titer negatif terhadap anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

sedang pada kelompok perlakuan mulai bleeding ke-2 menunjukkan titer positif adanya anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ karena nilai titer anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ diatas nilai dua kali COV.

Dari hasil ini menunjukkan bahwa respon imun terhadap $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan terbentuknya anti - $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang terbaik dihasilkan pada bleeding ke-5 dari perlakuan II.

5.2.3. Penentuan Berat Molekul dengan SDS-PAGE 10%

Untuk mengetahui berat molekul antibodi (anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$) hasil induksi dari antigen ($\text{PGF}_{2\alpha}$) dapat menggunakan metode SDS-PAGE 10%. Hasilnya dapat dilihat pada gambar 5.3.



Gambar 5.3. Hasil SDS-PAGE Anti- PGF_2 alfa

Hasil uji SDS-PAGE 10% pada gambar 5.3. lebih memperjelas bahwa anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ merupakan respon imun humoral terhadap induksi $\text{PGF}_{2\alpha}$. Antisera yang ditimbulkan terhadap peptida-peptida

yand terdapat pada $\text{PGF}_{2\alpha}$ adalah sebagai akibat *conserved epitope*
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

(Aulanniam,2003). Pada gambar 5.3. tampak bahwa $\text{PGF}_{2\alpha}$ mendeteksi anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ sebagai suatu pita-pita protein dengan rataan BM 139,7237kD (lampiran 3) . Besarnya molekul anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dikarenakan antibodi yang terbentuk adalah antibodi poliklonal. Hal ini sesuai dengan pendapat Harnes (1998) yang menyebutkan bahwa antibodi sekunder mengikat pada region Fc dari berbagai macam imunoglobulin, dan afinitasnya tergantung pada spesies dan isotype antibodi.

Penghitungan berat molekul dari pita-pita protein yang terdapat pada membran nitroselulose dilakukan dengan cara membandingkan dengan berat molekul dari marker (M) dan dari relatif factor (RF). Berdasarkan penghitungan antara BM dan RF dengan menggunakan regresi linier diperoleh persamaan $Y = 5,2421 - 0,9328 X$ (Y = BM pita protein yang dicari, X = RF pita protein yang dicari).

Berdasarkan hasil uji spesifitas reaksi dengan menggunakan metode Dot Biot dan SDS-PAGE 10% antara $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ menunjukkan adanya reaksi positif sehingga dapat diyakini bahwa data titer IgG yang terukur pada metode Indirect Elisa adalah respon dan $\text{PGF}_{2\alpha}$ yang bersifat imunogenik karena masih dapat menimbulkan respon imun humoral.

5.3. Labelling Anti- $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan enzim alkali fosfatase

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

Labelling ini dilakukan pada serum hasil purifikasi pada *bleeding* ke-5, hasil labelling tersimpan dalam kantong selofan sebanyak dua buah dengan jumlah masing-masing sekitar 0,2 ml.

5.4. Pemeriksaan Imunohistokimia

Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan melalui tiga tahapan kegiatan

5.4.1. Penyuntikan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ pada hewan coba

Penyuntikan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ telah dilakukan pada lima ekor kambing lokal betina yang telah pernah beranak dan berada pada fase luteal. Satu ekor kambing disuntik dengan PBS sebagai kontrol dengan dosis 2 cc secara submukosa vulva, dua jam kemudian kambing disembelih. Dua ekor kambing disuntik dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ dengan dosis 5 mg secara submukosa vulva, selang satu dan dua jam kemudian kambing disembelih. Dua ekor kambing sisanya disuntik dengan hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ 10 mg secara submukosa vulva, selang satu dan dua jam kambing disembelih.

Safuran alat kelamin yang diambil untuk pemeriksaan histologis meliputi potongan vulva, vagina, serviks, korpus uteri dan kornua uteri, potongan-potongan tersebut kemudian disimpan dalam larutan formalin 10%.

5.4.2. Pembuatan preparat histologis

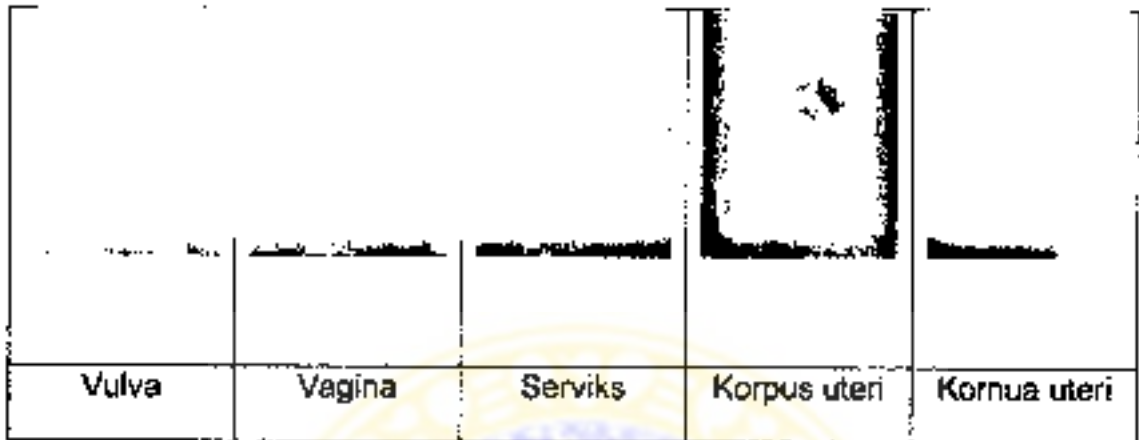
Pembuatan preparat histologis telah dilakukan (Lampiran 4) dan didapatkan *slide* untuk dilanjutkan dengan pemeriksaan

imunohistokimia. Hasil kontrol dan perlakuan sebelum pemeriksaan

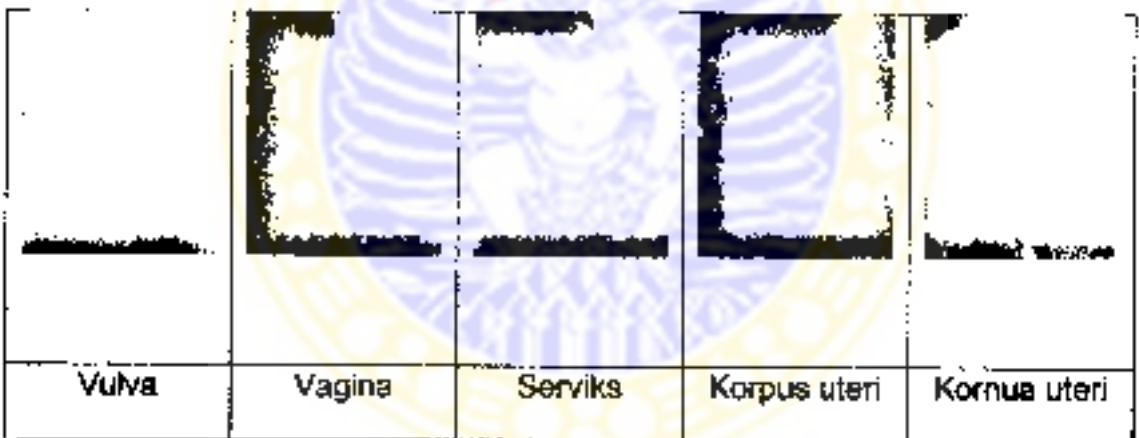
ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

imunohistokimia dapat dilihat pada gambar 5.4. dibawah ini.

Potongan histologis alat kelamin kambing kontrol



Potongan histologis alat kelamin kambing perlakuan

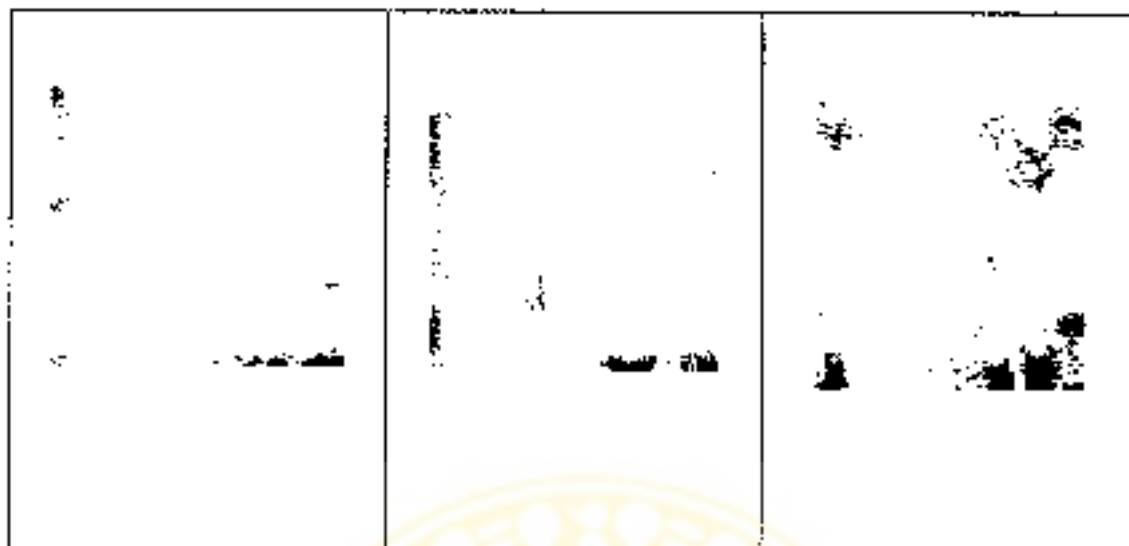


Gambar 5.4. Gambaran histologis saluran alat kelamin kambing kontrol dan perlakuan.

5.4.3. Pemeriksaan Imunohistokimia

Pemeriksaan imunohistokimia dilakukan dengan metoda Avidin-Biotin Kompleks (Lampiran 5). Gambar 5.5. menunjukkan

adanya ikatan antigen, antibodi primer dengan antibodi sekunder yang telah mengalami biotinilasi.



Gambar 5.5. Hasil Imunohistokimia positif dengan metoda ABC

Gambar 5.5. menunjukkan bahwa ikatan antigen dan antibodi berwarna kecoklatan, sedangkan inti berwarna biru oleh karena telah dilakukan *counter stain* dengan pewarna haematoxylin –eosin (HE). Nurhidayat (2000) menyebutkan bahwa metoda avidin-biotin- kompleks (ABC) merupakan teknik modifikasi dari imunohisto tidak langsung, dimana satu antigen dari bahan aktif diikat oleh antibodi dengan dua tahapan. Antibodi primer berikatan dengan antigen langsung, selanjutnya antibodi primer berikatan dengan antibodi sekunder yang telah mengalami biotinilasi.

Perjalanan antigen (hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$) dari tempat disuntikkan (submukosa vulva) ternyata berjalan berdasarkan interaksi antar sel dan terutama berjalan pada bagian dari mukosa sel-sel saluran alat kelamin, hal ini sesuai dengan pernyataan Hafez (2000) yang menyebutkan bahwa ada

empat cara komunikasi antar sel, untuk hormon asam lemak seperti hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$, komunikasi dilakukan secara *paracrine* artinya $\text{PGF}_{2\alpha}$ berdifusi melalui cairan ekstraseluler menuju sel tetangga yang terdekat, demikian seterusnya sehingga mencapai target organ atau untuk mencapai sirkulasi darah.

Goldsby *et al* (2000) menyatakan bahwa bila antigen diperkenalkan pada tubuh, antigen akan terkonsentrasi pada organ limfold perifer. Suatu kelenjar getah bening adalah filter yang sangat efisien yang mampu menangkap lebih dari 90% dari setiap antigen yang dibawa melalui sistem limfatik aferens. Selanjutnya disebutkan pula bahwa antigen atau kompleks antigen-antibodi masuk ke kelenjar getah bening melalui pembuluh limfatik aferen dalam bentuk sendiri atau bergabung dengan sel pertransport antigen misalnya, sel dendritik atau sel langerhans dan makrofag. Limfosit masuk ke dalam kelenjar getah bening melalui sistem limfatik atau dari pembuluh darah oleh karena adanya ekstrasvasi melalui sel endotel tinggi pada vanula post kapiler.

Potongan pada *slide* komua uteri tidak ditemukan adanya ikatan antigen dan antibodi, hal ini menunjukkan bahwa hormon $\text{PGF}_{2\alpha}$ sudah cukup mencapai uterus kemudian dengan mekanisme *counter current transport* akan mencapai target organ untuk selanjutnya melisis korpus luteum fungsional.

VI.1. Kesimpulan

Serangkaian penelitian untuk menghasilkan anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ terlabel alkalin fosfatase yang selanjutnya digunakan untuk penelusuran jalur luteolitik hormon $PGF_{2\alpha}$ yang diberikan secara submukosa vulva telah dilakukan.

Kesimpulan yang didapat dari penelitian pertama dan kedua adalah :

- Dosis optimal imunisasi dengan menggunakan hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ untuk dapat menghasilkan anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ adalah sebesar 500 μ g dalam ajuvan CFA/IFA pada kelinci betina, sedangkan profil anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ dapat diketahui dengan serangkaian uji dot blot, elisa dan SDS-PAGE.
- Anti-prostaglandin $F_{2\alpha}$ terlabel alkalin fosfatase dapat dipakai untuk membuktikan jalur luteolitik hormon prostaglandin $F_{2\alpha}$ yang diberikan secara submukosa dalam menimbulkan birahi pada kambing betina lokal dengan menggunakan teknik imunohistokimia

VI.2.Saran

Saran yang bisa disampaikan dalam penelitian ini adalah:

- Dalam upaya pembakuan teknik gertak birahi secara submukosa vulva, diperlukan hewan coba lain selain kambing.
- Penelusuran jalur luteolitik dengan metoda imunohistokimia perlu dikonfirmasi dengan hasil penelusuran dengan menggunakan metoda/teknik lain.

DAFTAR PUSTAKA



- Anonymous. 1991. Biochemicals Organic Compounds for Research and Diagnostic Reagents. Sigma. Chemical Company. p. 862
- Antama, W.T. 1992. Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan. PAU-Bioteknologi Universitas Gajah Mada Yogyakarta. Hal. 28-31.
- Aulanniam, 2003. Analisis Antibodi Hasil Induksi Bovine Zona Pelusida 3 Terglikosilasi (bZP3dG) untuk Pengembangan Vaksin Kontrasepsi. Disertasi, Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya
- Baratawidjaja, K.G., 2000. Immunologi Dasar. Edisi ke-4. Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Djojosoebagio, S. 1996. Fisiologi Kelenjar Endokrin. Cetakan I. Penerbit Universitas Indonesia Press. Jakarta.
- Dunbar, B.S. 1994. Protein Blotting A Practical Approach. The Practical Approach Series. Oxford University Press. pp. 6-9.
- Frandsen, R.D. 1992. Anatomy and Physiology of Farm Animals. 5th. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia
- Goer, J. 1993. Immunochemical Techniques Laboratory Manual. Academic Press. Harcourt Brace Javanovich, Publisher San Diego, California.
- Goldsby R.A., Thomas, J.K. and B.A. Osborne, 2000. Kuby Immunology Fourth Ed. New York. W.H. Freeman and Company.
- Hames, B.D., 1998. Gel Electrophoresis of Protein a Practical Approach. Third edition. The Practical Approach Series Oxford. New York, Tokyo Oxford University Press.
- Hardjopranjoto, S. 1982. Fisiologi Reproduksi. Cetakan III. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.
- Hardjopranjoto, S. 1995. Ilmu Kemajiran Pada Ternak. Airlangga University Press. Surabaya. Hal. 51, 77, 124.
- Hafez, E.S.E. 1993. Reproduction in Farm Animals. 6th. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. pp. 461-465.

- Hafez, E.S.E. 2000. *Reproduction in Farm Animals*. 7th. Ed. Lippincott Williams & Wilkins. A Wolters Kluwer Company. Philadelphia.
- Ismudiono, 1982. *Pengaruh Waktu Inseminasi terhadap Persentase Kebuntingan dengan Estrumate (PGF2 α) Sebagai Penggertak Birahi pada Sapi Perah di Grati*. Thesis. Fakultas Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Ismudiono, 1999. *Fisiologi Reproduksi Pada ternak*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Luckas, M and L. Bricker 2001 *Intravenous prostaglandin for induction of Labour*. The Cochrane Library, Issue 3.
- Mahaputra L. 1990. *Pengukuran Kadar Progesteron Air Susu dan LH Serum untuk Menentukan Status Reproduksi dan Upaya Penanggulangan Infertilitas pada Sapi perah Pasca Lahir*. Disertasi. Universitas Airlangga Surabaya.
- Malik, A., 2000. *Efektivitas Prostaglandin F2 alfa secara Intra Ovari Terhadap Penyerentakan Birahi Sapi Perah Frisian Holstein*. Tesis Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Surabaya.
- Milvae, R.A. 2000. *Inter - relationships between endothelin and prostaglandin F $_{2\alpha}$ in corpus luteum function*. Journals of Reproduction and Fertility Review of Reproduction, Vol 5 No. 1.
- Niswander, G.D., T.J. Reiners, M.J. Dickman and T.M. Nett. 1980. *Blood flow mediator of ovarian function*. In: E.S.E. Hafez ed. *Reproduction in farm animals*. 4th Ed. Lea & Febiger. Philadelphia.
- Nurhidayat. 2002. *Deteksi Bahan Aktif dengan Metode imunohistokimia. dalam Pemanfaatan Teknik Kultur Jaringan dan Histokimia dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis Kerjasama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya manusia Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional dengan Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor*.
- Okuda, K and D.J. Skarzynski 2000. *Luteal Prostaglandin F2 α : New Concepts of prostaglandin F2 α Secretion and Its Actions within the Bovine Corpus Luteum*. Asian-Aus. J. Anim. Sci. Vol 13, No 3 :390-400.
- Partodihardjo, S., 1992. *Ilmu Reproduksi Hewan*. Cetakan ke-3 Penerbit Mutiara Sumber daya. Hal 165 – 230.

Promega, 1996. *Protocols and Applications Guide*. 3th.Ed. Promega Corporation. All Rights Reserved. Printed in USA. Cat. # P. 1610. ISBN - 1-882274-57-1. P.292.

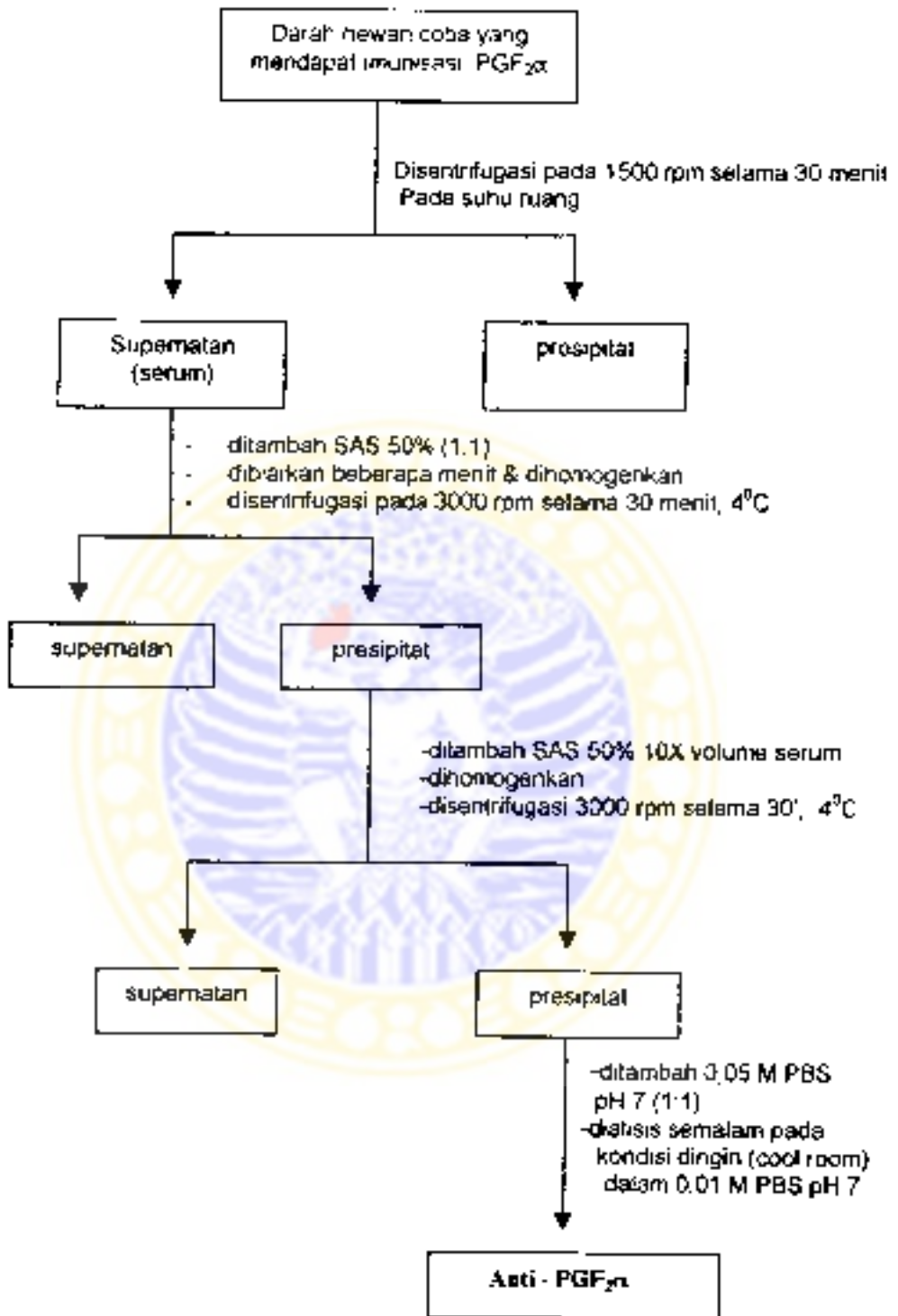
Setiawan,B.1983.FarmakologiProstaglandin,ThromboxanedanProstasiklin. Dalam Prostaglandin dan Implikasinya. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Editor : A. Tjokronegoro dan B. Setiawan.

Setijanto H.,2002. Teknik Mempelajari Biologi Sel : Identifikasi Beberapa Substansi/Senyawa yang Terlibat dalam Metabolisme Sel. Dalam Penelitian dan Terapan Bidang Biologi dan Biomedis. Kerjasama Proyek Peningkatan Kualitas Sumber Daya manusia Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional dengan Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Hewan Institut Pertanian Bogor.

Skarzynski, D.J. and K. Okuda. 1999. Sensitivity of Bovine Corpora Lutea to Prostaglandin F2 α in Dependent on Progesterone, Oxytocin and prostaglandins. *Biol.Reprod.* 60(6), 1292-1298.

Skarzynski, D.J., Y. Miyamoto and K. Okuda. 2000. Production of Prosta – glandin F2 alfa by Cultured Bovine Endometrial Cells in Response to Tumor Necrosis Factor alpha :Cell Type Specificity and Intracellular mechanisms. *Biologi of Reproduction* 62:1116 – 11120.

Steel, R.G.D. dan J.H. torrie. 1989. *Prinsip dan prosedur Statistika*. Edisi keempat. Alihbahasa Ir. Bambang Sumantri. Gremedia Pustaka Utama : 145-146.

Lampiran 1. Isolasi dan Purifikasi Anti-PGF_{2α}

Lampiran 2. Data titer kontrol dan anti-PGF serta data COV dengan Indirect Elisa

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga

bleed ke	ulangan kontrol								Rataan	SD	COV	2 x COV
	1	2	3	4	5	6	7	8				
											(Rataan/2SD)	
1	0.003	0.002	0.002	0.004	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.001	0.005	0.01
2	0.011	0.012	0.011	0.012	0.014	0.012	0.012	0.011	0.012	0.001	0.014	0.028
3	0.015	0.016	0.017	0.016	0.015	0.012	0.015	0.012	0.015	0.002	0.019	0.038
4	0.012	0.013	0.014	0.012	0.014	0.012	0.013	0.012	0.013	0.001	0.015	0.03
5	0.016	0.019	0.018	0.016	0.018	0.016	0.016	0.012	0.016	0.002	0.02	0.04
6	0.019	0.021	0.02	0.017	0.02	0.017	0.02	0.018	0.019	0.002	0.023	0.046
7	0.021	0.02	0.021	0.02	0.018	0.015	0.016	0.015	0.018	0.002	0.022	0.044
8	0.017	0.017	0.018	0.018	0.016	0.016	0.018	0.016	0.017	0.001	0.019	0.038
9	0.014	0.015	0.013	0.014	0.016	0.016	0.015	0.014	0.015	0.001	0.017	0.034

bleed ke	Ulangan anti-PGF								Rataan	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	0.003	0.002	0.002	0.004	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.001
2	0.055	0.056	0.056	0.056	0.056	0.057	0.055	0.054	0.056	0.001
3	0.063	0.064	0.066	0.064	0.066	0.065	0.064	0.062	0.062	0.003
4	0.068	0.072	0.072	0.07	0.067	0.076	0.073	0.07	0.071	0.003
5	0.121	0.125	0.116	0.125	0.117	0.116	0.123	0.121	0.121	0.004
6	0.11	0.111	0.103	0.104	0.107	0.106	0.11	0.109	0.108	0.003
7	0.112	0.11	0.104	0.116	0.106	0.099	0.109	0.098	0.107	0.005
8	0.09	0.089	0.093	0.091	0.093	0.089	0.098	0.09	0.090	0.012
9	0.073	0.073	0.073	0.075	0.071	0.069	0.071	0.074	0.072	0.002

Lampiran 3. Perhitungan Berat Molekul Pita Protein**Perhitungan Relatif Factor dari Marker**

RF (X)	BM (kD)
0,064	200
0,177	116
0,223	97,4
0,371	66
0,564	45
0,887	31

$$RF = \frac{\text{Panjang sumuran dari pita}}{\text{Panjang gel sesudah dirunning}}$$

Persamaan yang diperoleh :

$$Y = 5,2421 - 0,9328 X$$

Y = Berat molekul pita yang akan diukur

X = RF dari pita yang akan diukur

RF (X)	BM (kD)	Rataan ± SD
0,0634	152,3914	139,7237 ± 9,92587
0,0794	147,2433	
0,1111	137,5517	
0,1269	132,962	
0,1429	128,4703	

Lampiran 4. Prosedur pembuatan preparat Histologis

1. Organ kelamin kambing betina (vulva, vagina, servik dan uterus) dimasukkan dalam fiksator (formalin 10%)
2. Sampel dipotong dengan ukuran 1 X 1 X 0.5 cm
3. Dilakukan dehidrasi dengan cara mencuci sampel dengan air kran selama 30 menit
4. Masukkan kedalam alkohol 70%, alkohol 80%, alkohol 95%, alkohol 96%, alkohol absolut I dan alkohol absolut II (masing-masing selama 30 menit)
5. Dilakukan clearing dengan cara memasukkan sampel kedalam xylol I, xylol II (masing-masing selama 30 menit)
6. Dilakukan embedding dengan cara memasukkan sampel kedalam parafin I, parafin II (masing-masing selama 30 menit)
7. Dilakukan blocking / dicetak
8. Kemudian dilakukan pemotongan dengan ukuran 4 mikron selanjutnya diletakkan di obyek glass, dilakukan pewarnaan imunohistokimia

Lampiran 5. Prosedur Pewarnaan Imunohistokimia Metode ABC (Avidin-Biotin Kompleks)

1. Clearing dan rehidrasi preparat secara bertingkat
2. Bilas dengan destilate water (DW) 3 X @ 5 menit, keringkan cairan disekitar sayatan
3. Lingkari sayatan dengan paraffin pen
4. Rendam preparat di dalam larutan 3% Hidrogen peroksida dalam DW selama 15 menit pada suhu ruang.
5. Bilas dengan DW (3 X @ 5 menit)
6. Bilas dengan Phosphat Buffer Saline (PBS) (3 X @ 5 menit)
7. Inkubasi preparat dengan 10% larutan skim milk atau 10% normal goat serum selama 30 menit pada suhu ruang
8. Bilas dengan PBS (3 X @ 5 menit)
9. Inkubasi preparat dengan antibodi primer (anti-PGF_{2α})
10. Bilas dengan PBS (3 X @ 5 menit)
11. Inkubasi preparat dengan antibodi sekunder (IgG rat) terlabel Horseradish-peroksidase (HRP) selama 30 menit pada suhu ruang, pada waktu yang sama inkubasi 10 microliter avidin dan 10 microliter biotin dalam 1 cc PBS.
12. Bilas dengan PBS (3 X @ 5 menit)
13. Inkubasi preparat dengan campuran avidin dan biotin selama 30 menit pada suhu ruang
14. Bilas dengan PBS (3 X @ 5 menit)
15. Inkubasi preparat dengan kromogen (larutan Diaminobenzidine (DAB)) sambil diamati dibawah mikroskop
16. Counter staining dengan hematoksilin
17. Dehidrasi preparat, ditutup dengan cover glass

PROFIL PROGESTERON SERUM DARAH SAPI PERAH YANG DIGERTAK BIRAHİ DENGAN PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) SECARA INTRA MUSKULAR DAN SUBMUKOSA VULVA

Ririn Rimawati

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk memberi gambaran tentang profil progesteron serum darah sapi perah bangsa *Friesian Holstein* yang digertak birahi dengan Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) secara intra muskular dan submukosa vulva.

Hewan percobaan dalam penelitian ini adalah 16 ekor sapi perah paritas pertama berumur 2,5 - 3,5 tahun dengan berat badan 300 - 350 kg. Selama percobaan sapi diberi perlakuan yang sama dalam hal pakan, pemeliharaan, dan lingkungan. Keenam belas ekor sapi perah digertak birahi dengan pola penyuntikan dua kali, kemudian hewan percobaan dibagi menjadi dua kelompok yang masing – masing kelompok terdiri dari 8 ekor sapi perah. Kelompok pertama diberi perlakuan berupa penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ secara intra muskular dengan dosis 25 mg dan kelompok kedua diberi perlakuan berupa penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan dosis 7,5 mg. Perlakuan meliputi pengambilan serum darah yang dilakukan tiga kali yaitu pada saat penyuntikan $PGF_{2\alpha}$ (hari ke – 11), saat birahi (hari ke – 14) dan tujuh hari setelah birahi (hari ke – 21). Pengukuran kadar hormon progesteron serum darah sapi perah dilakukan dengan teknik RIA (*Radio Immuno Assay*) fase padat.

Penelitian ini menggunakan desain Rancangan Acak Lengkap (RAL), data hasil penelitian berupa kadar progesteron (ng/ml) dianalisis statistik dengan menggunakan uji t tidak berpasangan (*independent sample t test*) yang disajikan dengan *Statistik Program and Services Solution* (SPSS).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sapi perah 100% birahi. Kadar progesteron serum darah sapi perah yang digertak birahi dengan $PGF_{2\alpha}$ secara intra muskular dan submukosa vulva pada saat penyuntikan (hari ke – 11) secara berturut – turut adalah $3,060 \pm 2,763$ dan $2,456 \pm 1,611$, saat birahi (hari ke – 14) adalah $0,935 \pm 0,099$ dan $0,261 \pm 0,485$ dan tujuh hari setelah birahi (hari ke – 21) adalah $2,694 \pm 1,552$ dan $2,606 \pm 1,879$. Hal ini menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata terhadap profil progesteron sapi perah yang digertak birahi dengan prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) secara intra muskular maupun submukosa vulva ($p > 0,05$).

**KECEPATAN TIMBULNYA BIRAH DAN ANGKA
KERUNTINGAN PADA SAPI PERAH YANG DIGERTAK BIRAH
DENGAN PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ SECARA INTRA MUSKULER
DAN SUBMUKOSA VULVA**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

Oleh

FATKHUL HADI

NIM. 0698311982

Menyetujui

Komisi Pembimbing



Prof. Dr. Ismudiono, M.Sc., Drh.



Pudji Srianoto, M.Nes., Drh.

**KECEPATAN TIMBULNYA BIRAH DAN ANGKA KEBUNTING
PADA SAPI PERAH YANG DIGERTAK BIRAH DENGAN
PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ SECARA INTRA MUSKULER DAN
SUBMUKOSA VULVA**

Fatkhul Hadi

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan kecepatan timbulnya birahi dan angka kebuntingan pada sapi perah bangsa Friesian Holstein yang digertak birahi dengan Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) secara intra muskuler dan submukosa vulva.

Hewan percobaan dalam penelitian ini adalah 16 ekor sapi perah paritas pertama berumur $\pm 2,5-3,5$ tahun dan berat badan $\pm 300-450$ kg. Selama percobaan sapi perah diberi perlakuan yang sama dalam hal pakan, pemeliharaan dan pengaruh lingkungan. Keenambelas sapi perah tersebut digertak birahi dengan pola penyuntikan dua kali, kemudian dibagi menjadi dua kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 8 ekor sapi perah. Kelompok pertama disuntik dengan $PGF_{2\alpha}$ secara intra muskuler dengan dosis 25 mg dan kelompok kedua disuntik dengan $PGF_{2\alpha}$ secara submukosa vulva dengan dosis 7,5 mg. Setelah terlihat tanda-tanda birahi maka dilakukan inseminasi buatan pada sapi perah percobaan yang birahi. Pemeriksaan kebuntingan dilakukan dengan cara eksplorasi rektal 90 hari setelah inseminasi buatan (IB).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kecepatan timbulnya birahi pada sapi perah yang digertak birahi dengan $PGF_{2\alpha}$ secara intra muskuler dan submukosa vulva secara berturut-turut adalah $76,875 \pm 8,114$ jam dan $73,75 \pm 2,188$ jam. Sedang angka kebuntingan yang dari kedua kelompok tersebut sama yaitu sebesar 62,5 %.

Dari analisis data yang dilakukan ternyata kecepatan waktu timbulnya birahi setelah pemberian $PGF_{2\alpha}$ secara intra muskuler dan submukosa vulva tidak menunjukkan perbedaan yang nyata ($p > 0,05$). Jumlah sapi perah yang bunting setelah inseminasi buatan pada masing-masing kelompok adalah sama yaitu sebesar 62,5%.

**ANTIBODI HASIL INDUKSI PROSTAGLANDIN $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) DENGAN
PENAMBAHAN *COMPLETE FREUND'S ADJUVANT* YANG
DIBOOSTER *INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT*
DALAM DOSIS YANG BERBEDA**

Skripsi sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

oleh:

DIYAH ANDRIYANI

NIM 069912624

Menyetujui

Komisi Pembimbing,

Dr. Bambang Purnomo S., M.Sc., D.H.
Pembimbing Pertama

Kuncoro Puguh S., M.Sc., D.H.
Pembimbing Kedua

ANTIBODI HASIL INDUKSI PROSTAGLANDIN $E_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) DENGAN PENAMBAHAN COMPLETE FREUND'S ADJUVANT YANG DIBOOSTER INCOMPLETE FREUND'S ADJUVANT DALAM DOSIS YANG BERBEDA

Diyah Andriyani

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan membuktikan bahwa imunisasi $PGF_{2\alpha}$ dengan *adjuvant* dapat menimbulkan antibodi dan perbedaan pemberian dosis $PGF_{2\alpha}$ akan berpengaruh terhadap antibodi yang terbentuk. *Adjuvant* yang digunakan adalah *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *boosted* dengan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA).

Sejumlah delapan ekor kelinci jantan lokal (*Lepus tigris javanicus*) yang berusia enam sampai sembilan bulan dengan berat badan dua sampai tiga kilogram dibagi menjadi empat kelompok yang terdiri dari satu Kelompok Kontrol (diimunisasi dengan PBS dan *adjuvant*) dan tiga kelompok perlakuan (diimunisasi dengan $PGF_{2\alpha}$ dan *adjuvant* dengan perbandingan 1 : 1). Kelompok Perlakuan dibedakan berdasarkan dosis $PGF_{2\alpha}$ sebagai berikut : Perlakuan 1a 250 µg, Perlakuan 2a 500 µg dan Perlakuan 3a 750 µg. Masing-masing kelompok dilakukan imunisasi awal pada minggu pertama dan *boosted* tiga kali pada minggu ketiga, keempat dan kelima, dan diambil darah sebanyak delapan kali mulai minggu ketiga sampai kesepuluh.

Sampel serum darah yang didapat dilakukan uji purifikasi. Uji karakterisasi melalui metode *dot blot* dan rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap pola faktorial (2 perlakuan x 8 kali *bleeding* x 8 kali ulangan) yang dianalisis dengan uji *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji Z. Pengukuran titer antibodi dengan metode *indirect ELISA* dianalisis dengan ANOVA yang dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (5%).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa imunisasi $PGF_{2\alpha}$ dengan menggunakan CFA dan *boosted* dengan IFA dapat menimbulkan antibodi. Perbedaan pengaruh dosis $PGF_{2\alpha}$ terbukti mempengaruhi antibodi yang terbentuk.